



# Modulation des réponses inflammatoires par les microparticules

Abderahim Gaceb

## ► To cite this version:

Abderahim Gaceb. Modulation des réponses inflammatoires par les microparticules. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2014. Français. NNT : 2014ANGE0007 . tel-01198862

**HAL Id: tel-01198862**

**<https://theses.hal.science/tel-01198862>**

Submitted on 14 Sep 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Thèse de Doctorat

**Abderahim GACEB**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université d'Angers  
sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Physiologie

Spécialité : Physiologie et Physiopathologie Humaine

Unité de recherche : *Unité Inserm U1063 « Stress oxydant et pathologies  
métaboliques » (SOPAM)*

Soutenue le 05/12/2014

Thèse N° : 1411

## Titre de la thèse:

# Modulation des réponses inflammatoires par les microparticules

## JURY

Rapporteurs: **Eduardo ANGLES-CANO**, Docteur, INSERM UMRS 1140 Université Paris Descartes

**Florence PINET**, Docteur, INSERM UMR 744 Institut Pasteur de Lille

Examineurs: **Georges LEFTHERIOTIS**, Professeur des Universités - Praticien hospitalier CHU Angers

Directeur de Thèse : **Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA**, Docteur, INSERM U1063 SOPAM Angers

# Thèse de Doctorat

**Abderahim GACEB**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du*

***grade de Docteur de l'Université d'Angers***

*sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans*

**École doctorale : Biologie Santé**

**Discipline : Physiologie**

**Spécialité : Physiologie et Physiopathologie Humaine**

**Unité de recherche : Unité Inserm U1063**

**« Stress oxydant et pathologies métaboliques » (SOPAM)**

**Soutenue le 05/12/2014**

**Thèse N° : 1411**

## **Titre de la thèse:**

# **Modulation des réponses inflammatoires par les microparticules**

## **JURY**

Rapporteurs: **Eduardo ANGLES-CANO**, Docteur, INSERM UMRS 1140 Université Paris Descartes

**Florence PINET**, Docteur, INSERM UMR744 Institut Pasteur de Lille

Examineurs: **Georges LEFTHERIOTIS**, Professeur des Universités - Praticien hospitalier CHU Angers

Directeur de Thèse : **Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA**, Docteur, INSERM U1063 SOPAM Angers

# REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude et mon respect aux membres du jury.

A Mr le Docteur Eduardo ANGLES-CANO et à Mme le Docteur Florence PINET de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. A Mr le Professeur Georges LEFTHERIOTIS qui a accepté d'examiner ce travail.

Je remercie tout particulièrement Mr le Docteur Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA, mon directeur de thèse, pour son encadrement, ses conseils, ses remarques pertinentes, et tous nos échanges scientifiques. Je vous remercie pour votre grande ténacité qui m'a toujours poussée à donner le meilleur de moi-même.

Je tiens à exprimer ma grande reconnaissance à Mme le Docteur Maria del Carmen MARTINEZ pour la confiance qu'elle m'a accordée, sa gentillesse, sa disponibilité, sa passion pour la recherche et également pour sa grande culture scientifique. Je te remercie d'avoir répondu à mes nombreuses questions, de m'avoir aidé par tes nombreux conseils et de m'avoir remotivé quand il le fallait.

Ma gratitude est évidemment acquise à Monsieur le Professeur Frédéric GAGNADOUX, directeur de mon stage de master 2, pour les conseils qu'il m'a prodigués et de m'avoir poussé à réaliser une thèse.

Mes remerciements vont aussi à mes collègues de travail et tous les membres de l'unité U1063 anciens et actuels: à Caroline, Lucie, Emilie, Jacques, Raffaella, Mireille, Nicolas, Soazig, Sébastien, Gilles, Catherine B, Patricia, Catherine D et Isabelle.

Un très grand merci à tous mes amis, Particulièrement: Docteur Daniela, Docteur Manolo, Docteur Luisa, et Docteur Wojciech. Votre présence m'a permis de mener à bout cette étude.

Je remercie très chaleureusement mes deux amis Samuel et Gregory pour tous les moments de détente, soirées de Foot et toutes nos discussions plus ou moins sérieuses. Je vous remercie pour votre soutien et de m'avoir supporté après 17h.

Je remercie également tous les thésards que j'ai pu faire connaissance lors des congrès et aussi mes collègues thésards, anciens et actuels, qui m'ont permis de réaliser ce travail de thèse dans une bonne ambiance de laboratoire: Mehdi, Edward, Eid, Sylvain, Audrey, Ousama, Samuel, Vanessa, Liliana et Zainab. Je vous souhaite à tous bon courage pour la suite.

Je remercie aussi l'équipe de foot ASCHU Angers, l'équipe des frimeurs du Lundi et l'équipe des internes de l'hôpital d'Angers pour tous les beaux moments passés sur le terrain de football. Je remercie aussi l'équipe de la plongée sous-marine d'Angers (SUAPS) pour les différentes expéditions qui m'ont permis d'oublier la pression du travail.

Je remercie vivement mon ami l'architecte Dehmane qui a su me donner des conseils et m'encourager à persévérer lorsque j'en avais besoin.

Enfin je remercie toute ma famille, notamment mes parents, mes deux sœurs, mon frère, ma belle-sœur, mon petit neveu et mon grand-père Allah yerhmou, qui m'ont toujours soutenu au cours de mes longues études.

À vous tous et toutes, un grand *Merci!*

*A mes très chers parents*

*A mon frère et mes deux sœurs*

*A ma famille*

*A mes frères et amis*

# SOMMAIRE



|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABREVIATIONS.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>PUBLICATIONS &amp; COMMUNICATIONS .....</b>                      | <b>7</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES.....</b>                                       | <b>11</b> |
| <b>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>                               | <b>14</b> |
| <b>1ère partie: Inflammation et maladies cardiovasculaires.....</b> | <b>15</b> |
| <b>I- Maladies cardiovasculaires.....</b>                           | <b>15</b> |
| 1- Épidémiologie.....   | 15        |
| 2- Facteurs de risque cardiovasculaire .....                        | 15        |
| <b>II- Inflammation et risque cardiovasculaire .....</b>            | <b>17</b> |
| <b>III- Inflammation .....</b>                                      | <b>19</b> |
| 1- Définition .....   | 19        |
| 2- Le déroulement d'une réaction inflammatoire .....                | 20        |
| 3- Activation de l'inflammation.....                                | 20        |
| 3.1- Signaux de danger exogènes: les PAMPs .....                    | 21        |
| 3.2- Signaux de danger endogènes: les DAMPs .....                   | 21        |
| <b>IV- Le Sepsis .....</b>  | <b>23</b> |
| 1- Définition .....   | 23        |
| 2- Mécanismes physiopathologiques .....                             | 24        |
| 2.1- Production de cytokines pro et anti-inflammatoires .....       | 24        |
| 2.2- Production de médiateurs lipidiques .....                      | 25        |
| 2.3- Une dysfonction endothéliale.....                              | 25        |
| 2.4- Infiltration des cellules inflammatoires .....                 | 25        |
| 2.5- Un stress oxydant et nitrosant .....                           | 26        |
| 2.6- Coagulation .....  | 26        |
| <b>Conclusion.....</b>  | <b>28</b> |

## **2ème partie: L'isoforme non musculaire de la kinase de la chaîne légère de la myosine**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>(MLCKnm) .....</b>  | <b>29</b> |
| <b>I- Définition.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>II- Structure .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>III- Les isoformes de MLCK .....</b>                                    | <b>31</b> |
| <b>1- MLCKm .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>2- MLCKnm .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>IV- Fonctions .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>1- Fonction contractile de MLCKnm.....</b>                              | <b>32</b> |
| <b>2- Régulation de la barrière endothéliale .....</b>                     | <b>35</b> |
| <b>3- Autres fonctions de MLCKnm .....</b>                                 | <b>38</b> |
| <b>a-MLCKnm participe à l'inflammation vasculaire .....</b>                | <b>38</b> |
| <b>b- MLCKnm contribue à l'augmentation de la sévérité du cancer .....</b> | <b>39</b> |
| <b>c- MLCKnm participe au bourgeonnement de la membrane cellulaire...</b>  | <b>39</b> |
| <b>Conclusion.....</b>   | <b>39</b> |

## **3ème partie: Microparticules (MPs) ou Microvésicules .....**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I- La découverte des MPs .....</b>                          | <b>41</b> |
| <b>II- Définition des MPs .....</b>                            | <b>41</b> |
| <b>III- Caractéristiques des MPs .....</b>                     | <b>44</b> |
| <b>1- Structure, origine et distribution.....</b>              | <b>44</b> |
| <b>2- Composition.....</b>                                     | <b>44</b> |
| <b>a. Phospholipides .....</b>                                 | <b>46</b> |
| <b>b. Marqueurs de surface, Protéines, et enzymes .....</b>    | <b>46</b> |
| <b>c. Acides nucléiques .....</b>                              | <b>47</b> |
| <b>IV- Mécanisme de Production de MPs .....</b>                | <b>48</b> |
| <b>1- Redistribution des phospholipides membranaires .....</b> | <b>48</b> |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 2-    | La réorganisation du cytosquelette cellulaire: dégradation et contraction                           | 49  |
| V-    | Mécanisme d'interaction entre les MPs et les cellules cibles.....                                   | 50  |
| a.    | Interaction ligand-récepteur.....   | 50  |
| b.    | Transfert des composants .....  | 50  |
| c.    | Fusion et internalisation .....   | 51  |
| VI-   | Rôle de MLCKnm dans la libération des MPs .....   | 53  |
| VII-  | Rôle des MPs en physiologie et physiopathologie cardiovasculaire .....                              | 55  |
| a.    | Rôle en physiologie cardiovasculaire .....  | 55  |
| b.    | Rôle en physiopathologie cardiovasculaire .....   | 56  |
| VIII- | Rôle des MPs dans l'évolution du sepsis .....   | 58  |
| IX-   | MPs comme modulateurs de la réponse inflammatoire.....  | 61  |
| a-    | Effets pro-inflammatoires.....  | 61  |
| b-    | Effets anti-inflammatoires .....  | 62  |
|       | Conclusion.....   | 63  |
|       | BUT DE LA THESE .....   | 64  |
|       | RESULTATS EXPERIMENTAUX .....   | 66  |
|       | Mémoire .....   | 67  |
|       | Non-muscle myosin light chain kinase is critical for microvesicle-induced inflammation by endotoxin |     |
|       | INTRODUCTION ET BUT DE L'ETUDE .....  | 68  |
|       | MODELE ANIMAL ET CELLULAIRE.....  | 69  |
| 1-    | Souris knock-out MLCKnm (KO MLCKnm).....  | 70  |
| 2-    | Cellules primaires: cellules endothéliales d'aorte de souris .....                                  | 71  |
|       | MANUSCRIT .....   | 73  |
|       | DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....   | 121 |
|       | REVUES.....   | 130 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Revue 1: Extracellular vesicles: new players in cardiovascular diseases.....</b>  | <b>131</b> |
| <b>Revue 2: Microparticles as regulators of cardiovascular inflammation .....</b>  | <b>133</b> |
| <b>PUBLICATIONS .....</b>  | <b>135</b> |
| <b>Article 1: Circulating microparticles from patients with obstructive sleep apneas<br/>enhance vascular contraction: mandatory role of the endothelium .....</b>                           | <b>136</b> |
| <b>Article 2: PPAR<math>\alpha</math> regulates endothelial progenitor cell maturation and myeloid lineage<br/>differentiation through a NADPH oxidase-dependent mechanism in mice .....</b> | <b>138</b> |
| <b>Article 3: Vascular and hepatic impact of short-term intermittent hypoxia in a mouse<br/>model of metabolic syndrome .....</b>  | <b>140</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>   | <b>142</b> |

# **ABBREVIATIONS**

ADN: acide désoxyribonucléique

AoECs: aortic endothelial cells

ARN: acides ribonucléiques

ATP: adenosine triphosphate

ATR1: récepteur de type 1 de l'angiotensine II

AVC: accidents vasculaires cérébraux

Ca<sup>2+</sup>/CAM: complexe calcium–calmoduline

CCR5: récepteur de chimiokine

COX-2: cyclooxygénase-2

CRP: protéine réactive C

DAMPs: signaux de danger d'origine endogène = damage associated molecular patterns

DHE: dihydroéthidine

DM: dermatomyosite

ECG: électrocardiogramme

EGFR: récepteur du facteur de croissance épidermique

eNOS: NO synthase endothéliale

ERK1/2: extracellular signal-regulated kinases 1/2

FAP: facteur activateur des plaquettes

Fas: récepteur de mort cellulaire

FSC: forward scatter

FT: facteur tissulaire de coagulation

GMPC: guanylate monophosphate cyclique

HGMB1: high Mobility Group Box 1

HIF: hypoxia inducible factor

HSP: protéine de choc thermique

HTA: hypertension artérielle

ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1

IL-1: interleukine-1

IL-6: interleukine-6

IL-8: interleukine-8

IM: infarctus du myocarde

iNOS: NOS inductible

KO MLCKnm: souris knock-out MLCKnm

LDL: low-density lipoprotein

LPS: lipopolysaccharide

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1

MLC: chaîne légère régulatrice de la myosine

MLCKm: MLCK musculaire

MLCKnm: MLCK non musculaire

MLCKs: kinases de la chaîne légère de la myosine

MLCP: phosphatase de la chaîne légère de la myosine

MMP: métalloprotéinases

MPs: microparticules

MVs: microvésicules

MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup>: microvésicules circulantes dérivées des souris sauvages

MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>: microvésicules circulantes dérivées des souris déficientes en MLCKnm

NADPH oxydase: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

NALP3: NACHT-LRR-PYD containing protein

NF-κB: nuclear factor-kappa B

NLRP3: nucleotide-binding oligomerization domain leucine rich repeat and pyrin domain

nmMLCK<sup>+/+</sup> mice: souris sauvages

nmMLCK<sup>-/-</sup> mice: souris knock-out en MLCKnm

NO: monoxyde d'azote

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anion superoxyde

PAMPs: signaux de danger d'origine exogène = pathogen associated molecular patterns

PFP: platelet-free plasma



PKA: protéine kinase A

PKC: protéine kinase C

PM: polymyosite

PRP: platelet-rich plasma

PRR: pattern recognition receptors

PS: phosphatidylsérine

RANTES: regulated on activation normal T cell expressed and secreted

Rho A: Ras homolog gene family member A

ROCK I: Rho-associated coiled-coil protein kinase 1

ROS: espèces réactives d'oxygène

S1P: sphingosine-1-phosphate

SAHOS: syndrome d'apnée hypopnée obstructive du sommeil

SCA: syndromes coronariens aigus

Shh: sonic hedgehog

S1PR1: récepteur de la sphingosine-1-phosphate

SM: syndrome métabolique

SSC: side scatter

TLR4: toll-like receptor 4

TNF- $\alpha$ : facteur de nécrose tumorale alpha

VEGF: vascular endothelial growth factor

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

# **PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS**

## Articles publiés

- **Gaceb A**, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Extracellular vesicles: new players in cardiovascular diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014; 50; 24-28.
- Andriantsitohaina R, **Gaceb A**, Vergori L, Martinez MC. Microparticles as regulators of cardiovascular inflammation. *Trends Cardiovasc Med.* 2012; 22; 88-92.
- Tual-Chalot S, Fatoumata K, Priou P, Trzepizur W, **Gaceb A**, Contreras C, Prieto D, Martinez MC, Gagnadoux F, Andriantsitohaina R. Circulating microparticles from patients with obstructive sleep apneas enhance vascular contraction: mandatory role of the endothelium. *Am J Pathol.* 2012; 181; 1473-1482.
- Vergori L, Lauret E, **Gaceb A**, Andriantsitohaina R, Martinez MC. PPAR $\alpha$  regulates endothelial progenitor cell maturation and myeloid lineage differentiation through a NADPH oxidase-dependent mechanism in mice. Acceptor dans *Stem Cells*.

## Articles Soumis

- **Gaceb A**, Luisa Vergori, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Non-muscle myosin light chain kinase is critical for microvesicle-induced inflammation by endotoxin. Soumis dans *Am J RCCM*.
- Trzepizur W, **Gaceb A**, Arnaud C, Ribuot C, Levy P, Martinez MC, Gagnadoux F, Andriantsitohaina R. Vascular and hepatic impact of short-term intermittent hypoxia in a mouse model of metabolic syndrome. En revision mineur dans *PLoS ONE*.

## Communications

### Communications orales:

- **Gaceb A**, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Non-muscle myosin light chain kinase alters the release, the phenotype and the inflammatory messages carried by circulating microparticles in mice. EMBO meeting Amsterdam 2013 (communication orale).

- **Gaceb A**, Trzepizur W, Arnaud C, Ribuot C, Levy P, Andriantsitohaina R, Martinez MC, Gagnadoux F. Circulating microparticle levels and vascular function in a mouse model of combined intermittent hypoxia and high-fat diet. Journée Scientifique de l'IFR 132, Angers 2011. (Communication orale).

Communications affichées:

- **Gaceb A**, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Non-muscle myosin light chain kinase alters the release, the phenotype and the inflammatory messages carried by circulating microparticles in mice. Arch Cardiovasc Dis Suppl 2013, 5, 1-84, 286, page 4.
- Vergori L, Lauret E, **Gaceb A**, Soleti R, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Modulation of progenitor cell phenotypes in high-fat diet mice: role of PPAR-alpha. Arch Cardiovasc Dis Suppl 2013, 5, 1-84, 0292, page 12.
- Vergori L, Lauret E, **Gaceb A**, Soleti R, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Role of PPAR-alpha deletion on the differentiation of progenitors from the bone marrow of mice. Arch Cardiovasc Dis Suppl 2013, 5, 1-84, 0289, page 14.
- **Gaceb A**, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Non-muscle myosin light chain kinase alters the release, the phenotype and the inflammatory messages carried by circulating microparticles in mice. Fund Clin Pharmacol 2013, 1, 27, page 122.
- Vergori L, Lauret E, **Gaceb A**, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Role of PPAR-alpha deletion on the differentiation of progenitors from the bone marrow of mice. Fund Clin Pharmacol 2013, 1, 27, page 81.
- Vergori L, Lauret E, **Gaceb A**, Soleti R, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Modulation of progenitor cell phenotypes in high-fat diet mice: role of PPAR-alpha. Fund Clin Pharmacol 2013, 1, 27, page 81.

- Trzepizur W, **Gaceb A**, Arnaud C, Ribuot C, Levy P, Andriantsitohaina R, Martinez MC, Gagnadoux F. Circulating microparticle levels and vascular function in a mouse model of combined intermittent hypoxia and high-fat diet. *Fund Clin Pharmacol* 2013, 1, 27, page 5, 78.
- **Gaceb A**, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Non-muscle myosin light chain kinase alters the release, the phenotype and the inflammatory messages carried by circulating microparticles in mice. Scientific meeting of doctoral School of Biology Health Nantes Angers, 2012.
- Vergori L, Lauret E, **Gaceb A**, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Modulation of endothelial progenitor cells in high-fat diet mice: role of PPAR-alpha. Scientific meeting of IFR 132, Angers 2012.
- **Gaceb A**, Trzepizur W, Arnaud C, Ribuot C, Levy P, Andriantsitohaina R, Martinez MC, Gagnadoux F. Circulating microparticle levels and vascular function in a mouse model of combined intermittent hypoxia and high-fat diet. *Arch Cardiovasc Dis Suppl* 2012, 2, 1-84, 0289, page 25.
- Vergori L, Lauret E, **Gaceb A**, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Modulation of endothelial progenitor cells in high-fat diet mice: role of PPAR-alpha. *Arch Cardiovasc Dis Suppl* 2012, 2, 1-84, 0281, page 21.

## **LISTE DES FIGURES**

|  |    |
|--|----|
| Figure 1: Représentation schématique de différents facteurs de risque cardiovasculaire .....   | 16 |
| Figure 2: Les principaux mécanismes et les conséquences de l'inflammation chronique .....  | 19 |
| Figure 3: l'initiation de l'inflammation nécessite généralement des signaux de danger d'origine exogène (PAMPs) et/ou endogène (DAMPs).....                                    | 22 |
| Figure 4: Schéma de l'ensemble des mécanismes conditionnant l'évolution du sepsis .....  | 27 |
| Figure 5: Schéma représentatif de la structure protéique de l'isoforme non musculaire et musculaire de MLCK .....  | 30 |
| Figure 6: Schéma représentatif de la structure protéique des deux isoformes endothéliales de l'isoforme non musculaire de MLCK .....   | 32 |
| Figure 7: Schéma de l'activation de MLCKnm avec les sites de liaison à la calmoduline et la chaîne légère de la myosine.....   | 34 |
| Figure 8: Schéma montrant le rôle de MLCKnm dans la contraction du cytosquelette cellulaire et la régulation de la perméabilité endothéliale .....                             | 35 |
| Figure 9: Biogénèse des vésicules extracellulaires et contenu des MPs .....  | 43 |
| Figure 10: Représentation schématique du panel de molécules et des effets portés par les MPs: «modèle de la MP endothéliale» .....   | 45 |
| Figure 11: Mécanismes de formation des MPs et modes d'interaction avec les cellules cibles ..  | 52 |
| Figure 12: Schéma montrant les mécanismes impliqués dans la physiopathologie du syndrome des antiphospholipides: rôle de MLCKnm dans la libération des MPs endothéliales ..... | 54 |
| Figure 13: Rôle des MPs en homéostasie et en physiopathologie cardiovasculaire .....   | 58 |
| Figure 14: Rôle des MPs dans le sepsis .....   | 60 |



|   |     |
|---|-----|
| Figure 15: Schéma récapitulatif des principaux résultats de la première partie de l'étude.....  | 94  |
| Figure 16: Schéma récapitulatif des principaux résultats de la deuxième partie de l'étude ..... | 95  |
| Figure 17: Schéma récapitulatif de l'étude .....  | 101 |

## **DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **1<sup>ère</sup> partie : Inflammation et maladies cardiovasculaires**

### **I- Maladies cardiovasculaires:**

#### **1- Épidémiologie:**

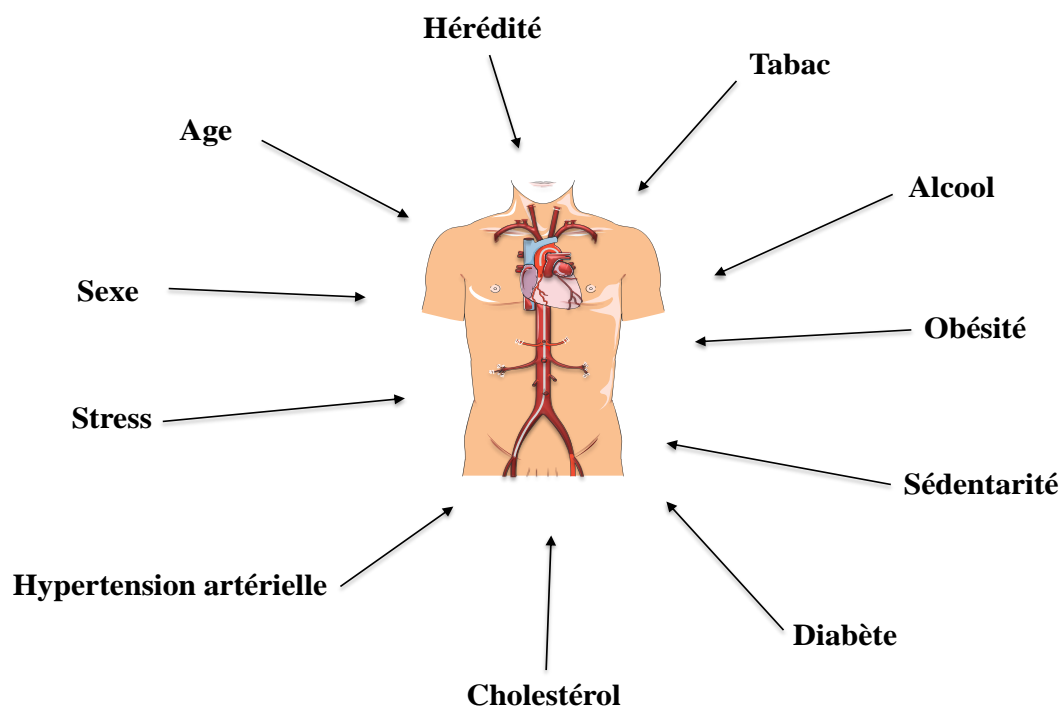
Les maladies cardiovasculaires se réfèrent aux pathologies qui affectent le cœur et les vaisseaux sanguins. Elles représentent la première cause de mortalité dans le monde. La mortalité cardiovasculaire est estimée à environ 1 à 3 décès prématurés chez les hommes et 1 à 5 décès prématurés chez les femmes dans de nombreux pays industrialisés. Au même temps, plus de 80 % des décès dus aux maladies cardiovasculaires ont lieu dans les pays en voie de développement et elles touchent autant les hommes que les femmes (Mathers et al., 2006; Baudin et al., 2009).

Parmi les 16,7 millions de décès annuels, 7,3 millions (43,7 %) sont dus à un infarctus du myocarde (IM), 5,5 millions (32,9 %) sont dus aux accidents vasculaires cérébraux (AVC), et 3,9 millions (23,4%) sont dus à l'hypertension artérielle (HTA) et autres maladies cardiovasculaires. D'après les projections, ces maladies devraient rester les premières causes de décès dans le monde (Mathers et al., 2006; OMS 2011). Ainsi, la recherche d'une thérapie efficace et préventive des maladies cardiovasculaires représente la mission principale de plusieurs laboratoires de recherche (Garcia et al., 2000).

#### **2- Facteurs de risque cardiovasculaire:**

Bien que la prise en charge des maladies cardiovasculaires s'améliore constamment, leur incidence augmente dans le monde entier. Le risque de développer une maladie cardiovasculaire donnée peut varier en fonction de la présence ou de l'absence de caractéristiques individuelles (âge, sexe, profil biologique et génétique...), socio-économiques

et/ou environnementales. Il est bien connu qu'il existe de nombreux facteurs de risque qui augmentent la possibilité de développer des maladies cardiovasculaires. La plupart d'entre eux sont liés, ce qui signifie que l'existence d'un facteur de risque, augmente la possibilité d'en avoir d'autres. Parmi ces facteurs, on trouve l'âge, le sexe, l'hypertension (HTA), le diabète, l'obésité, l'alcoolisme, le tabagisme et le stress (**Figure 1**). L'HTA est le facteur de risque cardiovasculaire le plus important et le plus fréquent. Elle atteint 31% de la population française adulte (18-74 ans) et malgré des avancées thérapeutiques, elle reste insuffisamment détectée, traitée et contrôlée. Parmi les facteurs de risques, on trouve aussi: les antécédents familiaux, la sédentarité, l'obésité androïde, et la ménopause.



**Figure 1: Représentation schématique de différents facteurs de risque cardiovasculaire.**

Parmi les facteurs de risque qui augmentent la possibilité de développer des maladies cardiovasculaires, on trouve: l'âge, le sexe, l'hérédité, le stress, l'hypertension, le cholestérol, le diabète, la sédentarité, l'obésité, l'alcoolisme, et le tabagisme.

Au même titre que le mauvais cholestérol (LDL) et l'hypertension, il existe un autre facteur de risque des maladies cardiovasculaires, il s'agit de «l'inflammation».

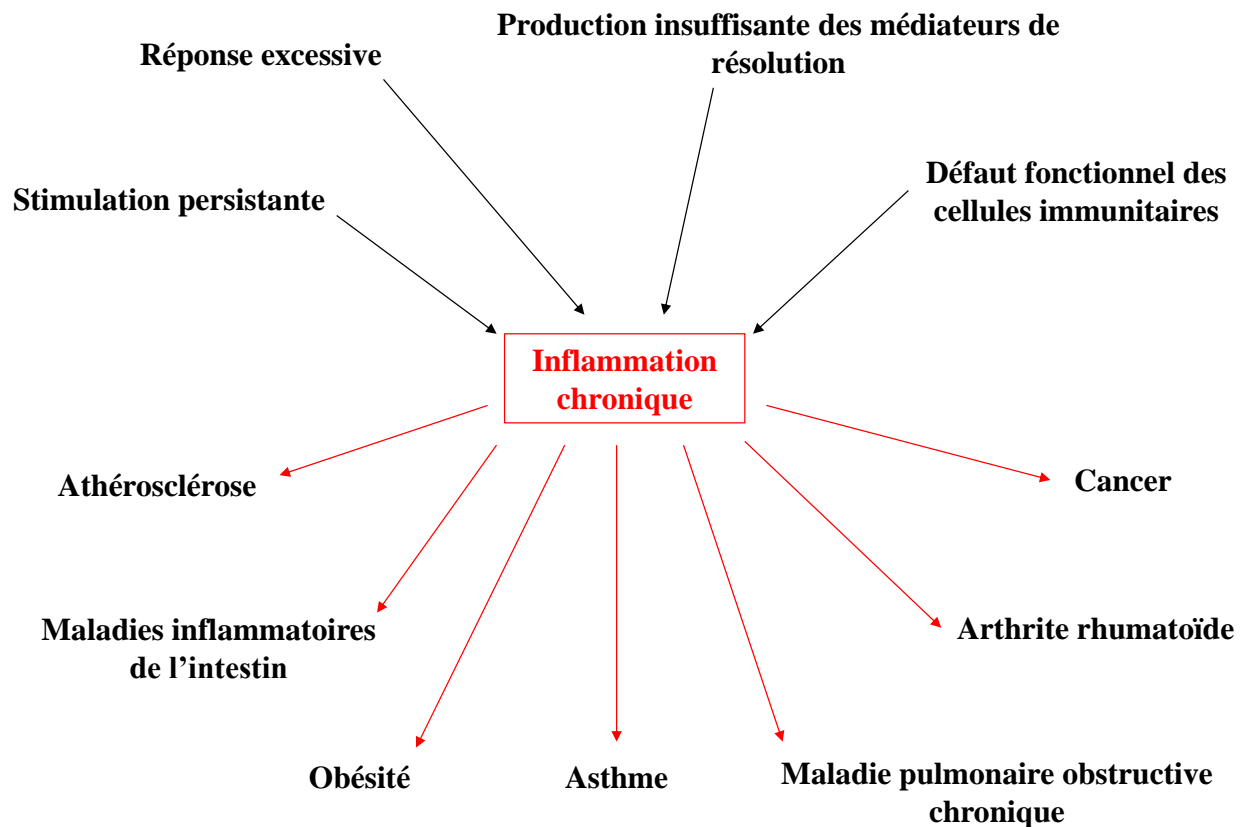
## **II- Inflammation et risque cardiovasculaire:**

Un grand nombre d'évidences soutient l'idée que l'inflammation chronique à travers une variété de mécanismes joue un rôle important dans l'initiation, la progression et l'aggravation de plusieurs pathologies cardiovasculaires y compris, l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral (**Figure 2**). Au cours de l'athérosclérose, l'inflammation artérielle est responsable de l'accumulation sous-endothéliale des lipoprotéines (comme le cholestérol), ce qui conduit à une augmentation de la libération des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissances, l'expression accrue des molécules d'adhésions, l'accumulation des cellules apoptotiques, et de l'infiltration des macrophages, qui à leur tour produisent des médiateurs pro-inflammatoires. Ce cycle vicieux d'activation de la réponse inflammatoire contribue au fil du temps, au développement et l'aggravation de la lésion d'athérosclérose (Weber and Noels., 2011). L'inflammation est présente dans tous les stades de la maladie d'athérosclérose, à partir de la formation des stries lipidiques à la rupture de la plaque jusqu'à l'événement coronarien aigu.

D'autre part, des études réalisées sur les coronaropathies au cours de la dernière décennie ont montré que les mécanismes inflammatoires jouent un rôle central dans le processus de prolifération néo-intimale et la resténose (après angioplastie) intra-stent, qui représentent les complications majeurs du traitement par le stenting. Plusieurs études cliniques portées sur les marqueurs précoces de la réponse inflammatoire ont montré que les patients présentant une production accrue de l'interleukine-6 (IL-6) immédiatement après le stenting coronaire ont un risque plus élevé de resténose (Xia et al., 2012).

De même, la reperfusion myocardique post ischémique peut induire une réponse inflammatoire caractérisée par une augmentation de la production du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ ) responsable d'une mort cellulaire, et une hyperperméabilité microvasculaire, par conséquence une augmentation de l'aire de la région infarctée (Kin et al., 2008). Actuellement, il est bien connu que le risque d'une ischémie-reperfusion myocardique produite suite à une thrombolyse, une angioplastie, ou la pose de stent, est associée à une augmentation du taux circulants des différents marqueurs inflammatoires, y compris des cytokines, des protéines de la phase aiguë (par exemple la protéine C réactive, (CRP)), des molécules d'adhésions cellulaires, des produits du métabolisme lipidique et des neutrophiles (Koenig et al., 2001). Dans les études épidémiologiques prospectives, le taux plasmatique des marqueurs inflammatoires notamment la CRP, prévoient non seulement l'infarctus du myocarde et le décès cardiovasculaire, mais aussi la calcification coronaire (Berk et al., 1990; Maseri et al., 1996; Kuller et al., 1996; Rosenson et al., 1998).

Toutefois, la thérapie basée sur le ciblage de la réponse inflammatoire permet de diminuer le risque et l'aggravation de différentes maladies cardiovasculaires. Par exemple, dans le cas de deux maladies inflammatoires, la polymyosite (PM) ou la dermatomyosite (DM), le risque de crise cardiaque est deux fois plus élevé que dans le reste de la population et l'administration des immunosuppresseurs, dans le but de ralentir le système immunitaire, permettent de diminuer le risque des complications cardiovasculaires (Tournadre et al., 2013).



**Figure 2: Les principaux mécanismes et les conséquences de l'inflammation chronique.**

D'après Nathan C et al, 2010.

D'une façon générale, les mécanismes expliquant le lien entre l'inflammation et les maladies cardiovasculaires restent très complexes et difficiles à expliquer. Ainsi, pour comprendre cette liaison, nous devons fournir un aperçu sur les différentes étapes du processus inflammatoire et son activation afin d'identifier le rôle de l'inflammation dans l'augmentation du risque cardiovasculaire.

### **III- Inflammation:**

#### **1- Définition:**

L'inflammation est une réaction adaptative des tissus vivants, vascularisés, en réponse à toute sorte de stimuli nocifs tels qu'une infection ou une agression tissulaire (physique ou

chimique). Il s'agit d'un processus habituellement bénéfique pour l'organisme car il permet l'élimination de l'agent pathogène et un retour à l'homéostasie par une réparation des tissus lésés.

## **2- Le déroulement d'une réaction inflammatoire:**

Une activation séquentielle de tout un ensemble de cellules et de médiateurs permet le déclenchement et le maintien de la réponse inflammatoire. Cette réponse commence par une étape de reconnaissance des signaux de danger endogène ou exogène faisant intervenir certaines cellules de l'organisme telle que les monocytes, macrophages, et lymphocytes.

L'inflammation fait intervenir aussi des cellules de la paroi vasculaire, des modifications de la matrice extracellulaire et la libération de nombreuses cytokines qui peuvent favoriser ou inhiber le développement de la réponse inflammatoire (cytokines pro ou anti-inflammatoires).

Quelle que soit son siège et la nature de l'agent pathogène, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente toujours les mêmes mécanismes. Néanmoins, les différentes étapes présentent des variations liées à la nature de l'agent pathogène, l'organe où elle se déroule, le terrain physiologique de l'hôte. Tous ces éléments conditionnent l'intensité, la durée de la réaction inflammatoire et l'aspect lésionnel.

## **3- Activation de l'inflammation:**

Les signaux de danger d'origine exogène (« pathogen-associated molecular patterns », PAMPs) ou endogène (« danger-associated molecular patterns », DAMPs) vont stimuler les récepteurs de l'immunité innée, les PRR (Pattern Recognition Receptors), et activent la phase aiguë de l'inflammation (**Figure 3**).



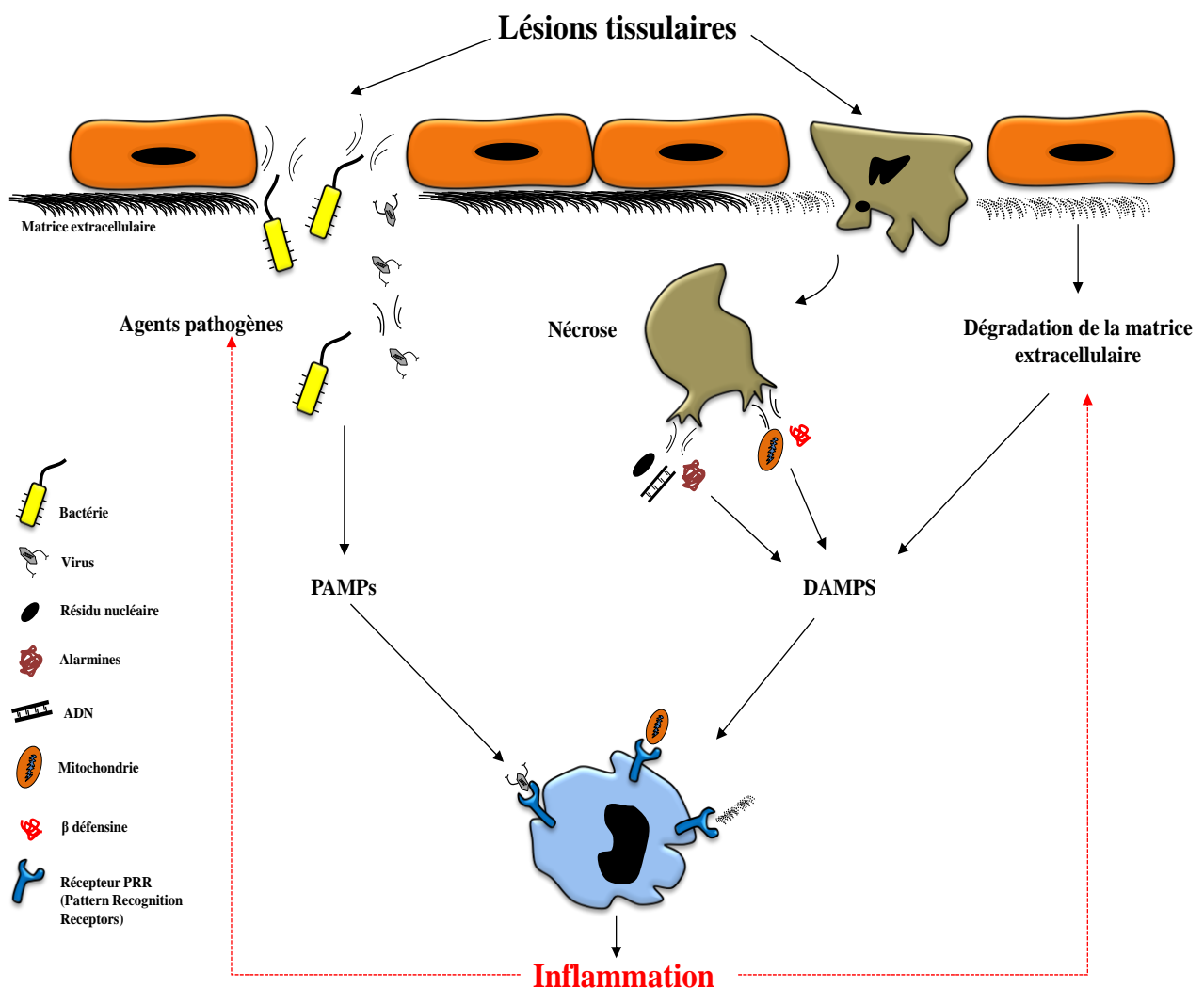
### **3.1- Signaux de danger exogènes: les PAMPs.**

Les signaux de dangers exogènes sont des motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes. Chaque groupe de micro-organismes possède un certain nombre de PAMP caractéristiques. Parmi les PAMPs, on trouve des composants des parois bactériennes (lipopolysaccharides, peptidoglycanes) et des flagelles (flagelline), des mannanes (polysaccharide) des champignons, des acides nucléiques bactériens et viraux (**Figure 3**) (Lee and Kim., 2007).

### **3.2- Signaux de danger endogènes : les DAMPs.**

Les signaux de danger endogènes ou DAMPs sont des motifs moléculaires émis par les cellules de l'organisme lors du stress cellulaire et qui peuvent initier et maintenir une réponse inflammatoire non infectieuse. Ils comprennent les protéines de choc thermique (HSP), le sulfate d'héparine, l'ADN, l'ATP, les HGMB1 (HighMobility Group Box 1), les  $\beta$ -défensines, l'acide urique, les alarmines et les protéines dérivées de la matrice extracellulaire générées suite à une lésion tissulaire, telle que des fragments d'acide hyaluronique. Ces signaux permettent le recrutement des cellules immunitaires exprimant les PRR, et favorisent ainsi la réponse inflammatoire (**Figure 3**). Par exemple: l'acide urique, soluble dans le milieu intracellulaire, précipite lorsqu'il est libéré dans le milieu extracellulaire pour donner des cristaux d'acide urique. Ces cristaux sont capables d'activer l'inflammasome à cryopyrine NALP3 (pour NACHT-LRR-PYD containing protein) ou NLRP3 (pour Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain), un complexe multiprotéique dont l'oligomérisation entraîne la maturation des cytokines pro-inflammatoires de la famille de l'IL-1. Dans la goutte, les cristaux d'acide urique déposés au niveau articulaire déclenchent une réaction inflammatoire (Choi et al., 2005; Petrilli and Martinon., 2007). Enfin, les DAMPs participent aussi au retour à l'homéostasie en promouvant la reconstruction du tissu lésé (Bianchi et al., 2007).

De plus, le processus inflammatoire peut également être déclenché en absence de toute infection ou traumatisme, notamment lors des pathologies dites « auto-inflammatoires » suite à une perte de contrôle du système immunitaire inné, aboutissant ainsi à une inflammation excessive.



**Figure 3: L'initiation de l'inflammation nécessite généralement des signaux de danger d'origine exogène (PAMPs) et/ou endogène (DAMPs).** D'après Nathan C et al, 2010. L'activation de l'inflammation se produit suite à une agression tissulaire par des agents pathogènes (PAMPs), reconnues par les récepteurs de l'immunité innée (PRR) portés par les cellules immunitaires. La mort cellulaire par nécrose et la dégradation de la matrice extracellulaire permet la libération des produits actifs (DAMPs), responsables de l'initiation et le maintien de la réponse inflammatoire.

Sous certaines conditions, la réponse inflammatoire peut devenir néfaste et de ce fait, participer au développement de différentes pathologies cancéreuses, immunitaires, cardiovasculaires et métaboliques. Une réponse inflammatoire insuffisante conduit à une immunodéficience ce qui augmente le risque des infections secondaires et le développement des cancers. Exacerbée, elle participe à la morbidité et la mortalité de plusieurs pathologies comme l'arthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn. Mal contrôlée, l'inflammation peut s'étendre au reste de l'organisme via la circulation générale, et elle conduit ainsi à des dommages tissulaires irréversibles locaux ou généralisés, parfois à un choc septique entraînant dans les cas les plus graves le décès (Nathan et al., 2002; Tracey et al., 2002; Barton et al., 2008). Le choc septique succède au sepsis qui est une maladie à très forte composante inflammatoire et pour laquelle on s'est intéressé au niveau de ce travail de thèse.

#### **IV- Le Sepsis:**

##### **1- Définition:**

Le sepsis est défini comme la réponse inflammatoire systémique à l'infection. Un sepsis sévère est un syndrome infectieux associé à une dysfonction d'organe, une hypoperfusion ou une hypotension. Le choc septique représente la forme la plus grave de cette réponse inflammatoire. Le pronostic vital du patient est souvent engagé et il s'agit d'une urgence thérapeutique (Dellinger et al., 2008).

Malgré les progrès de la médecine moderne, le sepsis est diagnostiqué trop tardivement car les symptômes cliniques et les signes biologiques actuellement utilisés ne sont pas spécifiques. Ce qui fait du sepsis l'une des principales causes de décès dans le monde, il représente avec un taux de mortalité hospitalière compris entre 30 et 60 %. (Kissoon et al., 2011).

## **2- Mécanismes physiopathologiques:**

Le sepsis est associé à une réponse inflammatoire explosive habituellement rencontré contre une infection bactérienne. Cette réponse est caractérisée par une surproduction de cytokines pro-inflammatoires, une dysfonction endothéliale, une infiltration excessive de cellules inflammatoires, un stress oxydant et nitrosant responsables d'une défaillance d'organes (**Figure 4**).

### **2.1- Production de cytokines pro et anti-inflammatoires:**

L'interaction directe entre les cellules d'inflammatoires et les composés bactériens conduit à la production des cytokines pro-inflammatoires via l'activation de récepteurs TLR (Schroder et al., 2010). Par exemple, les lipopolysaccharides (LPS) bactériens combinent avec des protéines solubles pour interagir avec le TLR4. Cette interaction va induire l'activation de la voie de signalisation NFκB dont le rôle est central dans l'expression de multiples gènes pro-inflammatoires (Rolli et al., 2010). Le sepsis est associé à une libération massive de cytokines inflammatoires. Des cytokines dites «précoces», produites en masse au cours des premières heures du sepsis souvent de manière transitoire, comprennent le TNFα, l'IL-6 et l'IL-1β et d'autres dites «tardives» comme le cas pour le HMGB-1 (High-Mobility Group Box-1) et le MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) (Calandra et al., 2003; Abraham et al., 2007; Mizock et al., 2009). Le degré d'élévation de cytokines inflammatoires est corrélé à la sévérité de l'infection et au pronostic (Pinsky et al., 1993).

Parallèlement, divers médiateurs anti-inflammatoires sont produits dans les heures qui suivent le développement du sepsis, notamment l'IL-10, l'IL-2, l'IL-4 et le récepteur soluble au TNFα, favorisant une compartimentalisation de l'inflammation au site de l'infection et atténuant ses effets systémiques (Pugin et al., 2007). Ces cytokines anti-inflammatoires peuvent agir directement sur la libération des cytokines pro-inflammatoires ou s'opposer à

leurs effets tissulaires. A titre d'exemple, l'IL-10 est libérée par les macrophages stimulés par l'endotoxine; elle peut bloquer la libération d'IL-1, IL-6 et le TNF $\alpha$ .

## **2.2- Production de médiateurs lipidiques:**

Plusieurs médiateurs lipidiques sont produits sous l'influence du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  pour amplifier la réponse inflammatoire. Ainsi, les eicosanoïdes (leucotriènes, prostacyclines, prostaglandines et thromboxanes) dérivés de l'acide arachidonique ont des effets sur le tonus vasculaire, l'agrégation plaquettaire, la perméabilité vasculaire, le chimiotactisme et modulent la réponse inflammatoire (Dobryniewski et al., 2007).

## **2.3- Une dysfonction endothéliale:**

La dysfonction endothéliale est un facteur clé contribuant à la dysfonction d'organes. La cellule endothéliale est activée à la suite d'interactions directes ou indirectes avec des composants microbiens et des cytokines inflammatoires, acquérant un phénotype pro-adhésif et procoagulant, et produisant divers médiateurs affectant le tonus et la perméabilité vasculaires. Des modifications structurelles caractéristiques des cellules endothéliales sont notées au cours du sepsis, telles que contraction, gonflement et séparation de la matrice extracellulaire sous-jacente. Par conséquent, une augmentation de la perméabilité endothéliale et l'infiltration des cellules inflammatoires (Aird et al., 2003).

## **2.4- Infiltration des cellules inflammatoires:**

Les polynucléaires neutrophiles (PMN) et les monocytes circulants sont précocement activés par les cytokines pro-inflammatoires, les PAMPs et les DAMPs. L'activité coordonnée des sélectines, intégrines et molécules d'adhésion exprimées par l'endothélium entraîne le recrutement des PMN et des monocytes dans les tissus infectés. Ces cellules migrent vers le site de l'infection, attirées par un gradient chimiotactique reconnaissable via les récepteurs

TLR (Abraham et al., 2007). L'activation des neutrophiles s'achève par leur mort apoptotique. Par contre les macrophages activés servent à la fois à la clairance bactérienne et à la phagocytose des neutrophiles apoptotiques, permettant la résolution de l'inflammation. Il apparaît que l'apoptose des neutrophiles est retardée au cours du sepsis, un effet qui pourrait contribuer au développement des dysfonctions d'organes (Rittirsch et al., 2008).

## **2.5- Un stress oxydant et nitrosant:**

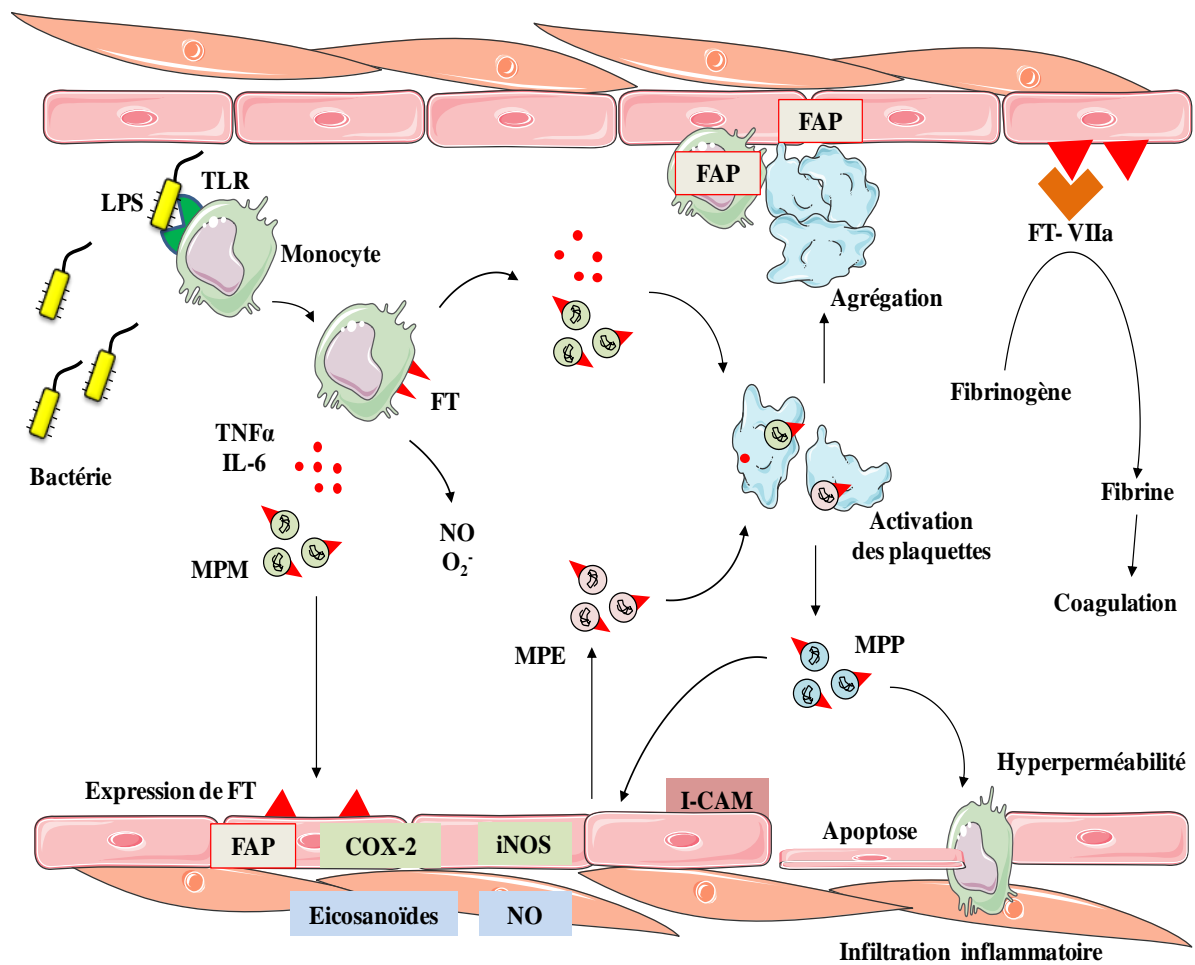
Une production en excès de radicaux libres d'oxygène (radical superoxyde  $O_2^-$  et dérivés), a lieu lors du sepsis, favorisant la destruction des microorganismes, mais risquant d'entraîner un effet cytotoxique par une altération des protéines et des acides gras membranaires (Pacher et al., 2007).

Le monoxyde d'azote (NO) est également produit en grande quantité au cours du sepsis secondairement à l'expression et à l'activation de la NO-synthétase inducible (iNOS). Il joue un rôle-clé dans la vasoplégie du choc septique, en provoquant une relaxation vasculaire et une résistance à l'action vasoconstrictrice des catécholamines et de l'angiotensine. Le NO et le superoxyde réagissent l'un avec l'autre pour former le péroxynitrite, qui participe aux dommages tissulaires. L'administration d'inhibiteurs sélectifs de la iNOS et de certains antioxydants exerce des effets bénéfiques sur les dysfonctions d'organes dans le sepsis expérimental (Liaudet et al., 2000; Pacher et al., 2007).

## **2.6- Coagulation:**

Une activation précoce de la coagulation a lieu lors du sepsis, par l'action du complément et des cytokines (notamment IL-6, l'IL-1 et le TNF) sur l'endothélium et les cellules immunes, entraînant une expression augmentée de facteur tissulaire et l'activation de la voie extrinsèque. Parallèlement, une réduction de l'activité fibrinolytique par une augmentation de la production de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène PAI-1 (plasminogen activator

inhibitor) alors que les anticoagulants endogènes (protéine C, antithrombine III, inhibiteur du facteur tissulaire) diminuent. L'ensemble de ces processus conduit à la formation de microthrombi et à l'obstruction de la microcirculation, réduisant la perfusion tissulaire. L'administration d'anticoagulants (protéine C activée recombinante) peut, dans certains cas, réduire les dysfonctions d'organes et améliorer le pronostic (Levi et al., 2010).



**Figure 4: Schéma de l'ensemble des mécanismes conditionnant l'évolution du sepsis.** LPS, lipopolysaccharide; TLR, toll like receptor; FT, Facteur tissulaire; NO, monoxide d'azote (stress nitrosant); O $_2^{\cdot-}$ , anion superoxyde (stress oxydant); MPM, microparticules monocytaires; FAP, facteur activateur des plaquettes; COX-2, cyclooxygénase 2; iNOS, NO synthase inductible; MPE, microparticules endothéliales; MPP, microparticules plaquettaires. I-CAM, molécule d'adhésion intercellulaire; VIIa, facteur de coagulation.

**Conclusion:**

Dans le cas de choc septique, L'agressivité des mécanismes physiopathologiques augmente rapidement ce qui explique le risque élevé de décès. Parallèlement au développement des connaissances des mécanismes de choc septique, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été développées (Rivers et al., 2001; Bernard et al., 2001; Annane et al., 2002). Elles ont récemment permis une amélioration du pronostic de l'état de choc septique (Harrison et al., 2006). Avec l'exploration de nouveaux champs physiopathologiques (immunité innée, dysfonction mitochondriale, apoptose...), nous pouvons espérer le développement dans les années à venir de nouvelles thérapeutiques permettant de faire encore reculer la mortalité du sepsis.

Récemment, il a été montré qu'une délétion de gène réduit la mortalité des souris suite à un choc septique via une diminution de l'inflammation systémique (Ralay Ranaivo et al., 2007). Ce gène code pour une protéine qui est l'isoforme non musculaire de la kinase de la chaîne légère de la myosine «MLCKnm».



## **2<sup>ème</sup> partie : L'isoforme non musculaire de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCKnm)**

### **I- Définition:**

Les MLCKs est une famille de protéines cytosolique dont la fonction principale est de phosphoryler la chaîne légère régulatrice de la myosine (MLC-2), favorisant ainsi l'interaction actine–myosine et contraction cellulaire. Au niveau des cellules musculaires, le mécanisme déclencheur de la contraction est l'augmentation du calcium intracellulaire. Le calcium se lie à la troponine C, ce qui permet la levée d'inhibition de la troponine I, démasquant ainsi le site de liaison actine myosine permettant la contraction cellulaire. L'activation de MLCK musculaire (MLCK108, 108kD, MLCKm) permet la phosphorylation de la myosine ce qui augmente l'intensité de la contraction.

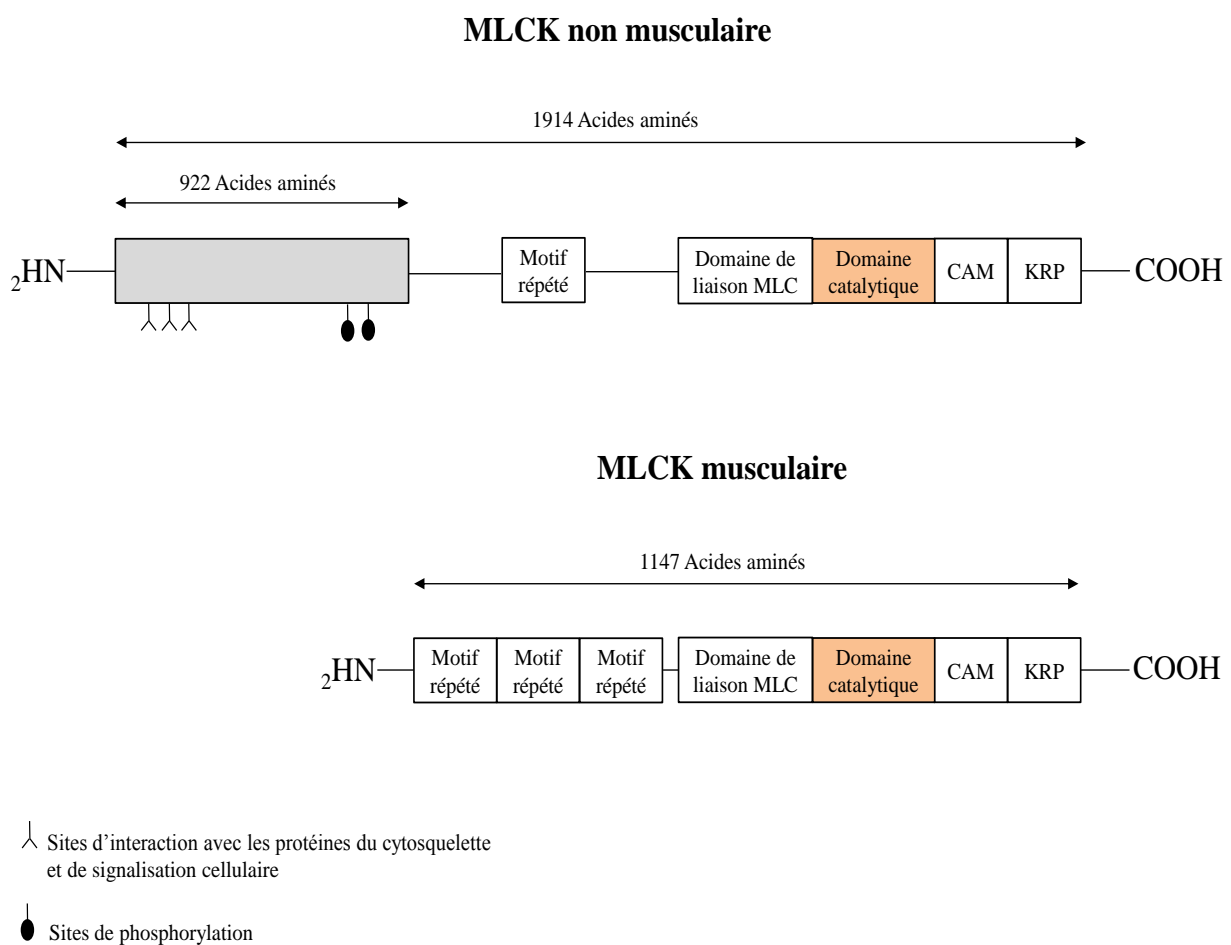
Cependant, dans les cellules non musculaires telles que les cellules endothéliales, l'épithélium et les neutrophiles, il existe une autre isoforme de MLCK nommée MLCK non musculaire (MLCK210, 210kD, MLCKnm) (Verin et al., 1998). Cette isoforme participe principalement à la contraction du cytosquelette et la transduction de la signalisation cellulaire. Contrairement au MLCKm, l'activation de MLCKnm représente le mécanisme déclencheur de la contraction cellulaire. Il semble que les membres de la famille de MLCKnm peuvent présenter des propriétés fonctionnelles, structurales, et régulatrices distinctes de l'isoforme musculaire.

### **II- Structure:**

MLCKnm est constituée de 1914 acides aminés. A son extrémité C terminale, on trouve une séquence KRP très conservée à travers les espèces et commune à l'ensemble des membres de la famille de MLCK. Le domaine KRP est suivie par un domaine de liaison à la calmoduline, qui permet d'activer l'activité kinase de MLCKnm suite à sa liaison avec le complexe calcium–calmoduline ( $\text{Ca}^{2+}$ /CAM). Ce domaine fonctionne aussi comme un domaine auto-

inhibiteur afin de supprimer l'activité constitutive de MLCKnm en l'absence du ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CAM}$ ). Enfin, un site catalytique de l'activité kinase suivie d'un domaine d'immunoglobuline qui se lie à la MLC (**Figure 5**).

Au niveau de son extrémité N terminale, la MLCKnm est caractérisée par une séquence supplémentaire de 922 acides aminés riche en sites de phosphorylations et d'interactions avec des protéines de cytosquelette et de signalisation cellulaire comme: la contractine (protéine de cytosquelette) et la protéine p60Src (protéine de signalisation) (Birukov et al., 2000; Verin et al., 1998).



**Figure 5: Schéma représentatif de la structure protéique de l'isoforme non musculaire et musculaire de MLCK.** D'après Verin A et al, 1998. L'isoforme musculaire de MLCK (1147 acides aminés) présente une grande similitude avec l'isoforme non-musculaire. MLCK non musculaire (1914 acides aminés) est caractérisée par une séquence supplémentaire de 922 acides aminés au niveau de l'extrémité N terminale, riche en sites de phosphorylations et d'interactions avec des protéines de cytosquelette et de signalisation cellulaire. MLCK, myosin light chain kinase.

### **III- Les isoformes de MLCK:**

#### **1- MLCKm:**

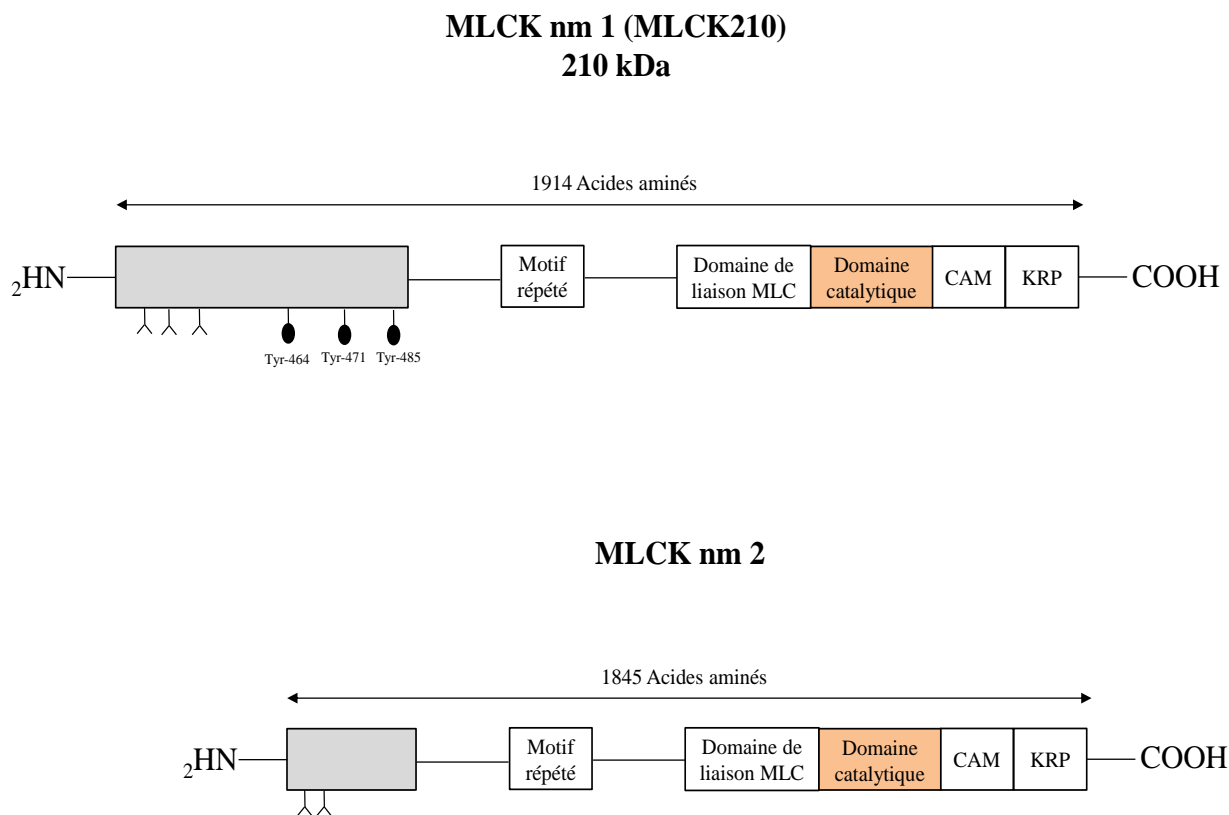
Il existe trois types de MLCK musculaire: squelettique (skMLCK), cardiaque (cMLCK), et du muscle lisse (smMLCK), produits des gènes mylk2, mylk3, et mylk1, respectivement. Ces isoformes portent une longue extrémité N-terminale qui contient un domaine de liaison à la fibronectine, deux domaines d'immunoglobulines, et de nombreux sites de phosphorylation. L'isoforme smMLCK porte 1147 acides aminés et un poids moléculaire de 108 kD. La smMLCK diffère nettement dans la structure des deux autres isoformes, et ayant une plus grande similitude avec l'isoforme non-musculaire (**Figure 5**) (Takashima et al., 2009; Chan et al., 2008).

#### **2- MLCKnm:**

Des travaux réalisés par le groupe de Garcia (Garcia et al., 1995) ont permis d'identifier et cloner un gène unique qui code pour quatre isoformes de MLCKnm (MLCKnm1 - 4). Ces isoformes sont des variantes d'épissage dérivés du gène mylk1 localisé sur le chromosome humain 3 (3qcen - q21).

L'isoforme MLCKnm1, précédemment connu sous le nom de MLCK endothéliale (MLCKe), est soupçonnée d'avoir une distribution tissulaire essentiellement endothéliale. MLCKnm1 présente un poids moléculaire très élevé de 210 kDa qui correspond à 1914 acides aminés et elle est également connue sous le nom de MLCK210. MLCKnm2 présente aussi une expression endothéliale. Elle est identique à MLCKnm1 mais il lui manque une séquence de 69 acides aminés au niveau de l'extrémité N terminale, contenant deux résidus nécessaires pour la phosphorylation de la tyrosine et l'activation de MLCK par le p60Src (**Figure 6**). MLCKnm3a et 3b sont identiques à MLCK1 et 2, respectivement, mais portant en plus une délétion distal supplémentaire sur l'exon 30 correspondant à une séquence de 51 acides

aminés. Concernant la séquence de l'isoforme MLCKnm4, elle n'est pas encore totalement connue (Shen et al., 2010).



**Figure 6: Schéma représentatif de la structure protéique des deux isoformes endothéliales de l'isoforme non musculaire de MLCK.** D'après Birukov et al, 2000. L'isoforme MLCKnm1 et MLCKnm2, ont une distribution essentiellement endothéliale. MLCKnm2 est identique à MLCKnm1, mais il lui manque une séquence de 69 acides aminés au niveau de l'extrémité N terminale contenant deux résidus nécessaires pour la phosphorylation de la tyrosine et l'activation de MLCK par le p60Src. MLCKnm, myosin light chain kinase non muscle.

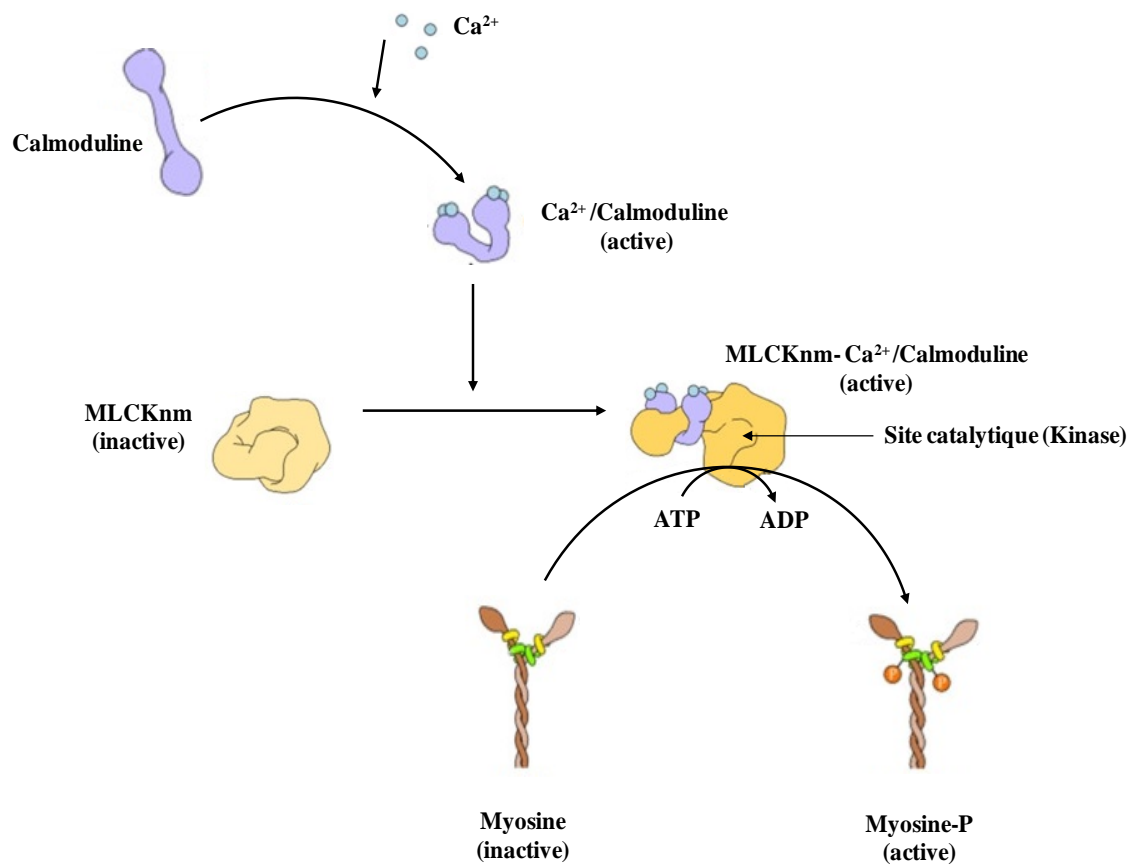
#### **IV- Fonctions:**

##### **1- Fonction contractile de MLCKnm:**

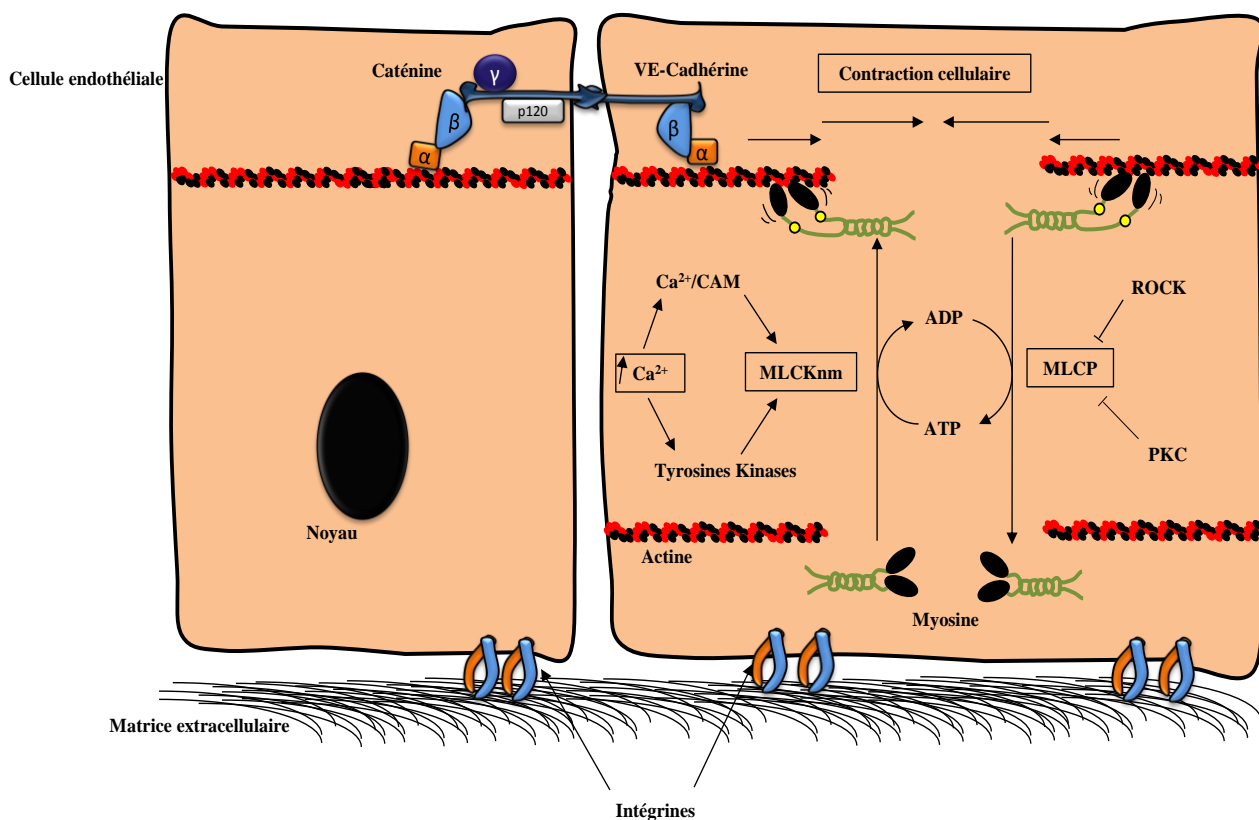
La contraction des cellules se produit par l'interaction entre l'actine et la myosine. Cette interaction est régulée par le statut de phosphorylation de MLC, et l'activation de MLCK. Au niveau des cellules non musculaires, une augmentation intracellulaire du calcium active

MLCKnm par la liaison du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CAM}$  sur le domaine de liaison à la calmoduline ce qui stimule l'activité kinase de la MLCKnm (**Figure 7**). D'autre part, l'augmentation de calcium active des tyrosines kinases, qui vont phosphoryler la tyrosine (Tyr-464 et Tyr-471) au niveau de l'extrémité N-terminal de MLCKnm, ce qui provoque son activation. Une fois activée, elle phosphoryle la chaîne légère régulatrice de la myosine MLC au niveau de la sérine (Ser-19) et la thréonine (Thr-18), ayant pour résultat un changement de la conformation tertiaire de la myosine, favorisant ainsi le mouvement contractile contre l'actine (**Figure 8**).

En s'opposant à l'activité de MLCKnm, la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCP) déphosphoryle la MLC, ce qui diminue la tension de contraction. Un contrôle optimal de l'état contractile résulte de l'équilibre entre l'activité de MLCKnm et MLCP. RhoA, un membre de la famille Rho GTPases, la protéine kinase C (PKC), et plusieurs autres kinases jouent un rôle critique dans la régulation de l'activité de MLCP. Une fois activé sous une forme liée au GTP, RhoA peut activer Rho kinase (ROCK) qui phosphoryle par la suite et inhibe MLCP, entraînant une augmentation de la phosphorylation de la myosine et une contraction cellulaire. Il est également prouvé que ROCK phosphoryle directement MLC in vitro dans les cellules endothéliales, et participe à l'augmentation de la contraction du cytosquelette cellulaire responsable d'une hyperperméabilité endothéliale (**Figure 8**). La fonction contractile de MLCKnm est importante pour la contraction du cytosquelette, la migration cellulaire et les processus d'endo/d'exocytose. Récemment, au niveau endothéliale, il a été montré que MLCKnm joue un rôle central dans la signalisation cellulaire, l'adhésion cellule-cellule ainsi que la fonction de barrière (Amano et al., 1996; Sanchez et al., 2007).



**Figure 7: Schéma de l'activation de MLCKnm avec les sites de liaison à la calmoduline et la chaîne légère de la myosine.**



**Figure 8: Schéma montrant le rôle de MLCKnm dans la contraction du cytosquelette cellulaire et la régulation de la perméabilité endothéliale.** D'après Kumar P et al, 2009.

L'activation de MLCKnm par sa liaison avec le complexe  $Ca^{2+}$ /CAM ou bien une phosphorylation de la tyrosine au niveau de son extrémité N-terminal; conduit à la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine. La phosphorylation de la myosine conduit à un changement de sa conformation tertiaire, et la génération du mouvement contractile contre l'actine. La force de contraction de cytosquelette dirigée vers le centre de la cellule endothéliale permet la déstabilisation de l'adhésion cellule-cellule et une augmentation de la perméabilité endothéliale. La phosphatase de la chaîne légère régulatrice de la myosine (MLCP) déphosphoryle la myosine, ce qui diminue la tension de contraction. L'activité de MLCP est régulée par ROCK et PKC.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , P120 des sous unités des molécules d'adhésion cellule-cellule (VE-Cadhérine et Caténine).

## 2- Régulation de la barrière endothéliale:

L'une des fonctions clés des cellules endothéliales vasculaires, est de servir de barrière semi-sélective entre le sang circulant et le fluide interstitiel. L'intégrité de cette barrière est cruciale dans le maintien de l'homéostasie circulatoire et le bon fonctionnement d'organes. Une aberration pathologique de la fonction de barrière endothéliale conduit à une

hyperperméabilité responsable d'une extravasation du plasma et des cellules inflammatoires, entraînant une dysfonction d'organes. La perturbation de la fonction de barrière joue un rôle primordial dans la physiopathologie des maladies inflammatoires, des processus thrombotiques, des lésions traumatiques ou thermiques, le diabète, l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde et la tumorigenèse (Lund et al., 1992; Hashizume et al., 2000; Yuan et al., 2007; Shen et al., 2010).

La perte de l'intégrité de l'endothélium est un problème critique difficile à corriger cliniquement. Les efforts de plusieurs laboratoires ont révélé que la dysfonction de la barrière endothéliale est causée par un déséquilibre entre les forces d'adhésion inter-endothéliales et la tension centripète du cytosquelette cellulaire. Cependant, il existe de nombreuses preuves montrant que MLCKnm joue un rôle important dans le maintien de la barrière endothéliale. En effet, l'activation de MLCKnm génère une force centripète ce qui augmente la perméabilité paracellulaire et la transmigration des leucocytes conduisant à une dysfonction de la barrière vasculaire (**Figure 8**). Par exemple, l'activation des cellules endothéliales par de la thrombine conduit au développement d'une force isométrique (Goeckeler and Wysolmerski., 1995), fournissant des changements significatifs au niveau de la morphologie cellulaire et une augmentation de la perméabilité endothéliale (Garcia et al., 1986). Il résulte de la diminution du calcium intracellulaire ou l'inhibition de l'activité enzymatique de MLCKnm, une perte de la tension isométrique et l'atténuation marquée de l'hyperperméabilité endothéliale (Wysolmerski and Lagunoff., 1991; Garcia et al., 1995). Récemment, il a été démontré que MLCKnm est un médiateur commun de la dysfonction de la barrière endothéliale induite par plusieurs molécules de signalisation comme: le monoxyde d'azote/guanylate monophosphate cyclique (NO/GMPc) et la PKC (Shen et al., 2010).

De plus, il est connu que la liaison du LPS à son récepteur TLR4 au niveau des cellules endothéliales, conduit à l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B responsable d'une



augmentation de la libération de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation intracellulaire du calcium suivie par une hyperperméabilité endothéliale (Burke et al., 1993). Dans ces conditions, il a été montré aussi que MLCKnm participe au réarrangement du cytosquelette cellulaire et la génération d'une force de contraction qui module l'ouverture des jonctions serrées et la formation des lacunes intercellulaires à travers l'endothélium, ce qui favorise le passage des cellules inflammatoires (Norwood et al., 2000; Ma et al., 2005). Lors de l'hypoxie, l'activation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  module la perméabilité endothéliale par une surexpression de MLCKnm et une augmentation de la phosphorylation de MLC. La diminution de l'expression de HIF-1 $\alpha$  par un siRNA spécifique permet de prévenir la surexpression de MLCKnm et ainsi l'hyperperméabilité endothéliale induite par l'hypoxie (Qi et al., 2011).

Indépendamment de son activité kinase, MLCKnm présente la capacité à établir des liens entre les protéines du cytosquelette via son extrémité N-terminal et réguler ainsi la perméabilité endothéliale. MLCKnm sert d'échafaudage pour les protéines du cytosquelette comme les cytolinkers, et la superfamille de plakin, comme MACF, BPAG1-a/b. Ainsi, il a été montré par des techniques d'imagerie cellulaire, qu'il existe une co-localisation de MLCKnm et la cortactine (une protéine du cytosquelette) dans l'endothélium pulmonaire humain. Cette association implique le domaine SH3 de la cortactine et le domaine de la liaison à l'actine au niveau de MLCKnm. Cette découverte a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à la base de la régulation de la barrière vasculaire via MLCKnm (Kudryashov et al., 2004). D'autre part, des études réalisées sur la kinase Abl ont montré que cette kinase phosphoryle MLCKnm au niveau de son extrémité N-terminal, ce qui permet le recrutement de la cortactine et l'actine formant le complexe Abl-MLCKnm-cortactine-actine, conduisant à la régulation de la perméabilité endothéliale (Dudek et al., 2010).

L'hyperperméabilité endothéliale peut également se produire par un mécanisme indépendant de MLCKnm. Par exemple, chez le rat, la phosphorylation de MLC par MLCKnm ne contribue pas à l'hyperperméabilité endothéliale induite par le facteur activateur des plaquettes ou la bradykinine. Cette hyperperméabilité endothéliale est due à une augmentation de la production de NO et une activation de la voie GMPc, puisque une inhibition de eNOS ou la voie de signalisation en aval, réduit considérablement la perméabilité endothéliale (Adamson et al., 2003). Actuellement, les mécanismes de régulation de la perméabilité endothéliale ne sont pas totalement bien maîtrisés. L'équilibre entre la tension centripète et l'adhésion cellule-cellule représente la base de la perméabilité des barrières microvasculaires.

Récemment, il a été montré que MLCKnm interagit également avec des protéines de voie de signalisation inflammatoire et de prolifération cellulaire. Ainsi, MLCKnm participe à l'inflammation vasculaire et la prolifération des cellules cancéreuses.

### **3- Autres fonctions de MLCKnm:**

#### **a. MLCKnm participe à l'inflammation vasculaire:**

MLCKnm joue un rôle important dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Il a été montré qu'elle participe au développement des lésions athérosclérotiques, en exacerbant la dysfonction de la barrière endothéliale et l'infiltration monocytaire en réponse à des facteurs pro-inflammatoires, y compris la thrombine, les LDL oxydées et le TNF- $\alpha$ . Les mécanismes moléculaires de la réponse cellulaire médiée par MLCKnm impliquent non seulement la phosphorylation de MLC et la contraction du cytosquelette cellulaire; mais aussi la signalisation par Src (molécule de signalisation inflammatoire), qui est indépendante de la phosphorylation de la MLC (Sun et al., 2011). L'activation de la voie de signalisation Src conduit à la transcription de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires responsables du maintien de l'inflammation vasculaire et la déstabilisation de la plaque d'athérome. De ce fait,

le blocage sélectif de MLCKnm représente actuellement une nouvelle piste d'investigation pour le développement d'une nouvelle approche pour traiter l'athérosclérose.

#### **b. MLCKnm contribue à l'augmentation de la sévérité du cancer:**

La protéine MLCKnm participe à la prolifération et la migration de nombreuses cellules cancéreuses. Il a été montré par des études réalisées *in vitro*, que l'augmentation du niveau d'expression de MLCKnm est corrélée à la sévérité du cancer du sein; et que l'inhibition de MLCKnm par son inhibiteur pharmacologique ML-7 est capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses, par la voie p38 MAPK. De plus, une autre étude réalisée sur le même type cellulaire a montré qu'il existe un cross talk entre MLCKnm et la voie ERK1/2 et que la phosphorylation de MLC ainsi que l'activation de la voie ERK1/2 (bcaténine, la survivine, cyclineD et c-Myc) par MLCKnm, conduisent à la prolifération et le métastase des cellules cancéreuses (Cui et al., 2010). Ces résultats montrent que MLCKnm pourrait présenter dans les jours à venir une cible potentielle pour lutter contre le cancer.

#### **c. MLCKnm participe au bourgeonnement de la membrane cellulaire:**

Au niveau des cellules embryonnaires humaines du rein (HEK), il a été montré que la stimulation du récepteur de type 1 de l'angiotensine II par un agoniste conduit au bourgeonnement de la membrane plasmique via l'activation de la voie RhoA/ ROCK/MLCK (Godin et al., 2010). Actuellement, cette étude est la seule en bibliographie qui étudie l'implication de MLCKnm au niveau du phénomène de bourgeonnement cellulaire.

#### **Conclusion:**

Actuellement, il est très bien connu que MLCKnm est impliquée dans les complications vasculaires associées à l'inflammation systémique. De plus, la suppression de MLCKnm ou bien son inhibition pharmacologique protège contre les effets délétères du choc septique et ses conséquences à la fois cardio-vasculaires et pulmonaires. Compte tenu du rôle central de

MLCKnm dans la perméabilité vasculaire et la signalisation inflammatoire, le ciblage de MLCKnm comme une nouvelle voie thérapeutique peut s'avérer une alternative efficace pour traiter ces problèmes. Ainsi jusqu'à présent, l'utilisation clinique d'inhibiteurs non-spécifiques tels que ML-7 et ML-9 n'a pas été possible, en raison des complications systémiques et des effets non spécifiques sur d'autres kinases. Idéalement, il est intéressant de développer des outils plus spécifiques pour cibler sélectivement MLCKnm et de prévenir ces effets délétères. Des arguments plus récents concernant les effets protecteurs de la sphingosine-1-phosphate (S1P) indiquent que l'activation du récepteur SIPR1 ou des tyrosines kinases en aval peut offrir d'autres approches d'inhibition de l'activité de MLCKnm endothéliale, et la suppression de l'hyperperméabilité vasculaire.

Dans ce travail de thèse, on s'est intéressé à évaluer les conséquences de la délétion de MLCKnm sur une nouvelle famille de facteurs appelées «Microparticules» (MPs) qui jouent un rôle important dans la physiopathologie du sepsis dans le but d'étudier l'hypothèse selon laquelle la délétion de MLCKnm pourrait générer des MPs bénéfiques avec des propriétés anti-inflammatoires participant à la diminution de l'inflammation systémique et la résistance au choc septique.

### **3<sup>ème</sup> partie : Microparticules ou Microvésicules**

#### **I- La découverte des Microparticules:**

L'un des principaux contributeurs à l'identification des MPs est le médecin britannique Peter Wolf en 1967 lors de ces études sur la cascade de coagulation du sang (Wolf et al., 1967). Quelques années auparavant, Erwin Chargaff et Randolph West ont découvert que le plasma sans plaquettes a des propriétés de coagulation ce qui contrarie la théorie de l'époque qui est que les plaquettes sont les seules responsables de la coagulation sanguine. Chargaff et West ont également constaté qu'une centrifugation à grande vitesse à  $31\,000 \times g$ , permet de réduire significativement la capacité du plasma à entraîner une coagulation sanguine. Par conséquent, ils ont conclu que le plasma humain possède une autre composante de coagulation sédimentée par une ultracentrifugation (Chargaff et West., 1946). En conclusion, dans sa publication en 1967, Peter Wolf a révolutionné la littérature de la coagulation sanguine précédente avec la découverte des fractions subcellulaires constituées de petites vésicules originaires des plaquettes appelées «poussière des plaquettes» «platelet dust», qui a ensuite été remplacé par le terme de «Microparticules» (MPs) ou «Microvésicules» (MVs) (Wolf et al., 1967).

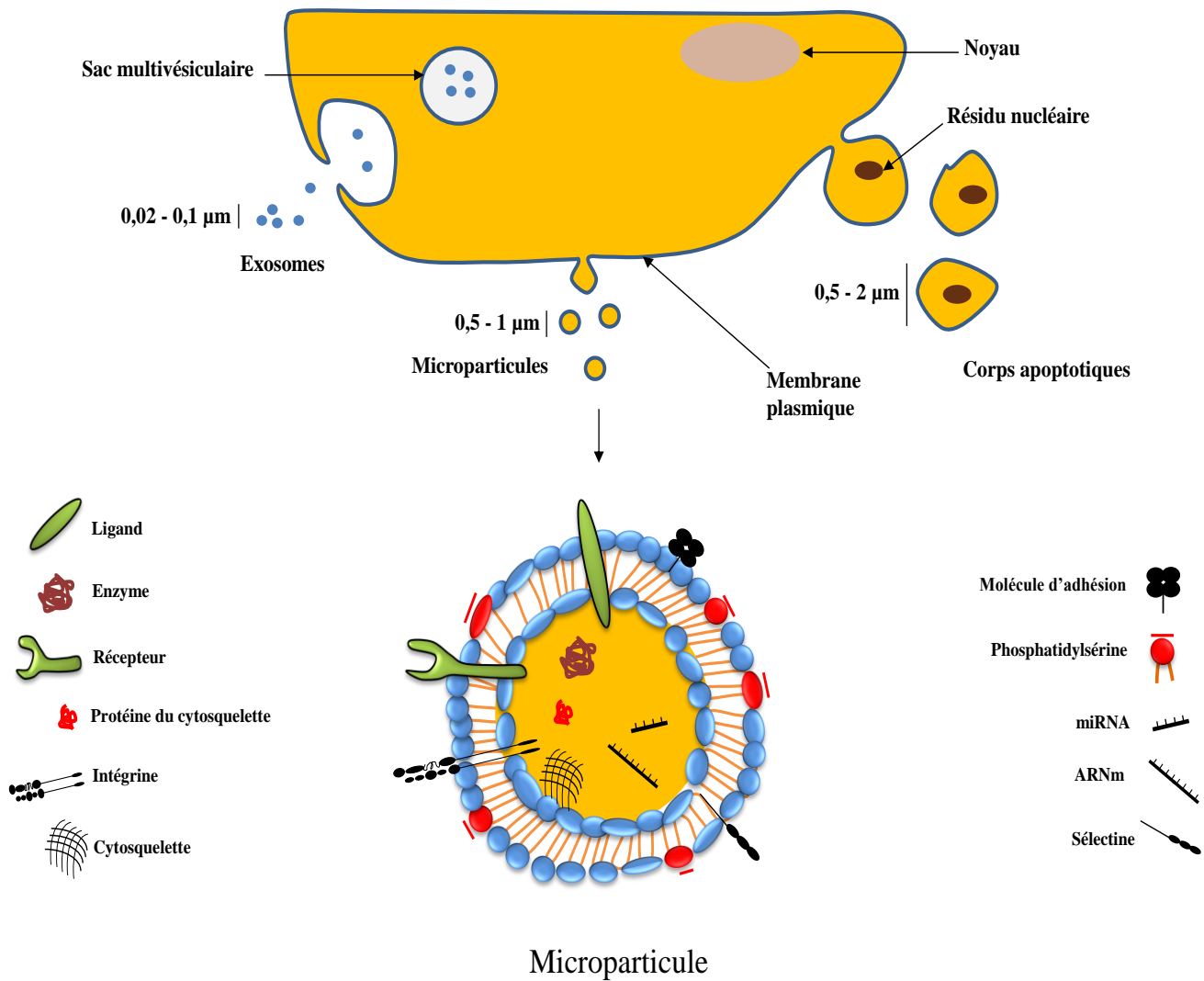
#### **II- Définition des MPs :**

Les MPs sont des vésicules membranaires hétérogènes en taille, libérées par la plupart des cellules de l'organisme en réponse à une activation cellulaire ou apoptose (Nieuwland et al., 1997; Heijnen et al., 1999; Beyer et Pisetsky., 2010). Ces vésicules sont produites à partir du bourgeonnement de la membrane plasmique et elles peuvent être porteuses de diverses protéines telles que: des enzymes métaboliques, des protéines du cytosquelette, des marqueurs

inflammatoires, et également des acides nucléiques (Martinez et al., 2005; Mause et al., 2010).

Les MPs sont à différencier d'autres types de vésicules libérées par les cellules comme les exosomes et les corps apoptotiques. En effet, les exosomes sont des vésicules de très petite taille (0.02 - 0.1 $\mu$ m), formées à partir des endosomes tardifs. La membrane endosomale s'invagine et il y a formation de vésicules dans ce compartiment. Cette structure est appelée corps multivésiculaire. L'endosome peut ensuite aller fusionner avec le lysosome ce qui aboutira à sa dégradation; ou alors, l'endosome peut fusionner avec la membrane plasmique et cette fusion permet la libération des exosomes dans l'espace extracellulaire. Tandis que, les corps apoptotiques, vésicules de grande taille (0.5 - 2 $\mu$ m), formées lors de la phase tardive de l'apoptose suite à une fragmentation cellulaire. Ces vésicules ont une teneur élevée en éléments cytoplasmiques et nucléaires (protéines et acides nucléiques) (Kerr et al., 1972; Elmore et al., 2007; Tual-Chalot et al., 2011; El Andaloussi et al., 2013; Akers et al., 2013) **(Figure 9)**.

Bien que d'abord les MPs soient assimilées à une poubelle cellulaire inutile, elles sont considérées actuellement comme une nouvelle voie de communication intercellulaire. Elles présentent un véritable intérêt clinique en physiologie et en physiopathologie à la fois comme biomarqueurs via leur nombre et bioeffecteur via leur fonction. En effet, les MPs circulantes dans le plasma initient la coagulation du sang, favorisent l'inflammation, modulent le système immunitaire et participent au maintien de l'homéostasie cardiovasculaire (Martinez et al., 2005).



**Figure 9: Biogénèse des vésicules extracellulaires et contenu des MPs.** D'après Gaceb et al, 2014. Les exosomes (0,02 - 0,1  $\mu\text{m}$ ) sont formées à l'intérieur de la cellule et transporté vers l'extérieur à l'aide d'un sac multivesiculaire. Les corps apoptotiques sont des vésicules de grande taille (0,5 - 2  $\mu\text{m}$ ) détachés de la cellule lors de la phase terminale de l'apoptose. Ils sont riches en composants nucléaires (nucléosomes, histones et des fragments nucléaires). Les MPs (0,5 - 1  $\mu\text{m}$ ) produites par bourgeonnement de la membrane plasmique, portent à leur surface la phosphatidylsérine, les molécules d'adhésion, les sélectines, les intégrines, des ligands, et des récepteurs; tandis qu'à l'intérieur elles portent des protéines du cytosquelette, des enzymes, de l'ARNm et du miRNA.

### **III- Caractéristiques des MPs :**

#### **1- Structure, origine et distribution:**

Les MPs présentent une taille de 0.1 à 1µm de diamètre renfermant une partie du cytoplasme cellulaire, des acides nucléiques et des résidus du cytosquelette. Elles sont entourées d'une bicouche phospholipidique associée à des protéines indiquant leur origine cellulaire, des récepteurs, des ligands, sélectines et intégrines. Les MPs portent aussi de la phosphatidylserine (PS) qui transforme le feuillet membranaire externe en surface d'assemblage des facteurs de la coagulation (Diamant et al., 2004; Rautou et al., 2011) **(Figure 9)**.

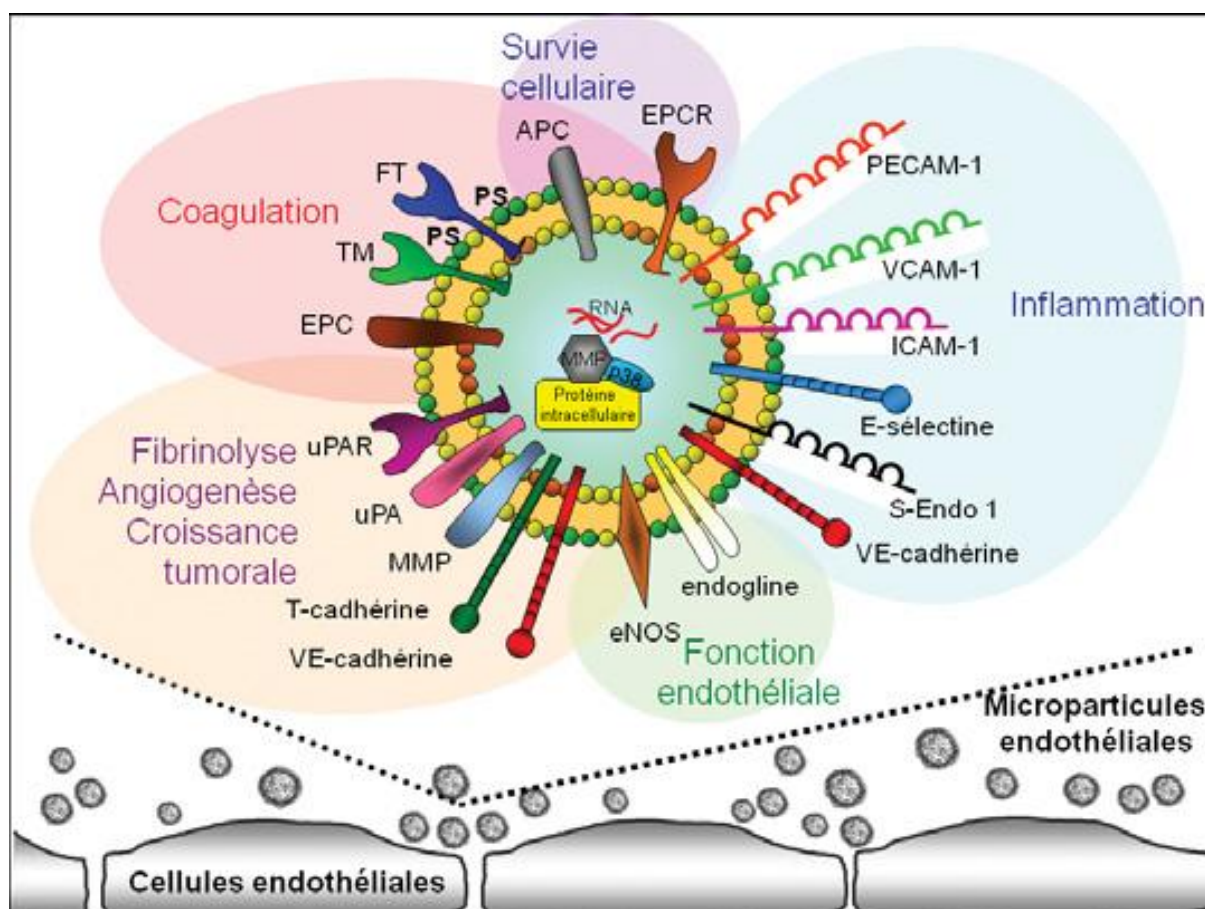
En théorie, toutes les cellules circulantes (tels que les lymphocytes (Soletti et al., 2009)) ou adhérentes (cellules endothéliales (Ou et al., 2011)) sont capables de produire des MPs. Dans le plasma du sang périphérique, on trouve des MPs d'origines cellulaires variées, principalement celles qui dérivent des plaquettes, lymphocytes, monocytes, neutrophiles et érythrocytes ainsi que des MPs dérivées des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses. De plus, des MPs, issues d'autres types cellulaires tels que les cellules tumorales ou les cellules trophoblastiques ont été aussi identifiées. Les MPs ont également été retrouvées dans d'autres liquides biologiques tels que l'urine, le liquide céphalo-rachidien, la salive, le liquide articulaire et l'humeur vitrée (Al Nedawi et al., 2008; Castellana et al., 2009; Moulin et al., 2010).

#### **2- Composition:**

Actuellement, il est bien connu que le nombre et la composition des MPs varient fortement selon l'origine cellulaire, et également, selon le stimulus impliqué dans leur formation **(Figure 10)**. Par exemple, les cellules endothéliales induites en apoptose en absence de sérum ou activées par le TNFα in vitro, libèrent des MPs quantitativement et qualitativement distinctes (Jimenez et al., 2003). Ainsi, l'analyse protéomique a révélé que le spectre des protéines



trouvées dans les MPs générées in vitro dépend en partie du stimulus utilisé pour induire leur formation (Miguet et al., 2006). Dans notre laboratoire, nous avons montré que, des lymphocytes activés par de la phytohématagglutinine et du phorbol-myristate acétate, puis induits en apoptose par l'actinomycine D génèrent des MPs porteuses du morphogène Sonic Hedgehog (Shh), alors que les MPs générées à partir de lymphocytes apoptotiques ne portent pas cette protéine (Martínez et al., 2006).



**Figure 10: Représentation schématique du panel de molécules et des effets portés par les MPs: «modèle de la MP endothéliale».** D'après Estelle Balducci, 2012. APC, protéine C activée; eNOS, nitric oxide synthase endothéliale; EPCR, récepteur endothélial de la protéine C; ICAM-1, molécule d'adhésion intercellulaire 1; MMP, métalloprotéase matricielle; PECAM-1, molécule d'adhésion plaquettes/endothélium 1; PS, phosphatidylsérine; FT, facteur tissulaire; TM, thrombomoduline; uPA, urokinase; uPAR, récepteur de l'urokinase; VCAM-1, molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1.

Les MPs portent ainsi des phospholipides, des protéines et des acides nucléiques:

**a. Phospholipides:**

Le contenu en phospholipides des MPs dépend fortement de la composition membranaire de la cellule d'origine. Il existe peu de données sur la composition lipidique des MPs. Les membranes des MPs issues de plasma des sujets sains sont riches en cholestérol et en phospholipides y compris la lysophosphatidylcholine, la phosphatidylcholine, la sphingomyéline, la lysophosphatidylsérine, la PS, la lysophosphatidyléthanolamine, la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylinositol (Weerheim et al., 2002). Les MPs peuvent être aussi riches en acide arachidonique. Cependant, aucune donnée n'est disponible sur l'altération du profil lipidique des MPs en fonction des pathologies.

Le transfert de ces lipides permet de réguler plusieurs fonctions dans la cellule cible. Par exemple, les MPs dérivées des plaquettes augmentent l'expression du cyclooxygénase-2 (COX-2) et la production des prostaglandines via le transfert de l'acide arachidonique et l'activation de la voie de signalisation MAPK/PKC au niveau des monocytes (U937 cells) (Barry et al., 1997; Barry et al., 1999). D'autre part, l'environnement lipidique peut modifier l'activité des protéines portées par les MPs. Il a été montré que l'enrichissement des monocytes humains avec du cholestérol conduit à l'augmentation de l'activité du facteur tissulaire (FT) porté par les MPs (Liu et al., 2007).

**b. Marqueurs de surface, protéines, et enzymes:**

En générale, la présence de glycoprotéines membranaires représentatives de la cellule parentale permet d'identifier l'origine cellulaire des MPs. A titre d'exemple, les MPs plaquettaires expriment la GpIb (CD42b), et la P-selectine (CD62P); les MPs érythrocytaires expriment la glycophorine A (CD235a) et les MPs leucocytaires expriment le CD45.

Les MPs sont porteuses aussi de diverses protéines telles que des facteurs de croissance, des cytokines, des enzymes métaboliques, des protéines du cytosquelette, des récepteurs, des protéines d'adhésion, des marqueurs de l'inflammation, des métalloprotéinases, des protéines de signalisation, etc. Par exemple, Mackenzie et al (2001) ont montré par des études *in vitro* que la stimulation des monocytes par du LPS induit la libération des MPs qui portent une forme active de l'IL-1 $\beta$ , une cytokine proinflammatoire. Une autre étude a montré que les MPs issues des cellules tumorales du gliome agressif peuvent transférer la forme tronquée du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) VIII, à des cellules saines exprimant un récepteur de type sauvage. Cela se traduit par la propagation de l'activité oncogénique, tels que la sur-activation des voies de signalisation par l'EGFR VIII, des changements dans l'expression des gènes cibles comme celui du « vascular endothelial growth factor » (VEGF) et la modulation des propriétés prolifératives des cellules réceptrices (Al-Nedawi et al., 2008).

### **c. Acides nucléiques:**

Initialement, les MPs ont été considérées comme des vésicules qui ne contenaient pas d'acides nucléiques. Cependant, des études récentes ont identifié la présence de l'ADN, de l'ARN dans les MPs générées *in vitro* à partir des cellules Jurkat et les cellules HL-60, du miRNA et pré-miRNA dans les MPs issues des cellules mésenchymateuses humaines et les cellules souches embryonnaires (Deregibus et al., 2007; Reich et al., 2009; Yuan et al., 2009; Chen et al., 2010; Diehl et al., 2012).

Des études ont montré que ce matériel génétique est bien fonctionnel. Ainsi, l'ARNm porté par les MPs des cellules souches permet la reprogrammation des progéniteurs hématopoïétiques et le miRNA des MPs des cellules progénitrices endothéliales active le programme angiogénique des cellules endothéliales (Camussi et al., 2013).

#### **IV- Mécanisme de production de MPs:**

Les MPs sont produites au cours de l'apoptose et suite à l'activation cellulaire par des agonistes solubles ou en réponse à un stress physicochimique. En fonction du type de stimulation à l'origine de leur formation, le mécanisme de production ainsi que la quantité de MP libérées peut varier (Jimenez et al., 2003; Martinez et al., 2006). En général, la formation des MPs est le résultat d'une interaction dynamique entre deux processus. D'une part, la redistribution des phospholipides membranaires et d'autre part, la réorganisation (dégradation et contraction) du cytosquelette cellulaire» (**Figure 11**).

##### **1- Redistribution des phospholipides membranaires:**

Le mécanisme de bourgeonnement des MPs fait intervenir une réorganisation des phospholipides membranaires. En effet, la membrane d'une cellule au repos est caractérisée par une asymétrie de répartition des phospholipides de la bicouche lipidique. Les phospholipides cationiques (phosphatidylcholine et sphingomyéline) sont localisés d'une façon prépondérante au niveau du feuillet externe de la membrane. A l'inverse, les phospholipides anioniques (phosphatidyléthanolamine et PS) sont concentrés au niveau du feuillet interne. Cette asymétrie de distribution des phospholipides membranaires est régulée par trois enzymes importantes: (i) une translocase responsable du transport de la PS et de la phosphatidyléthanolamine du feuillet externe vers le feuillet interne, contre leur gradient, (ii) une floppase dépendante de l'ATP qui fonctionne en coopération avec la translocase et qui permet l'orientation différentielle des aminophospholipides, et (iii) une scramblase, qui peut rapidement déplacer les aminophospholipides entre les feuillets membranaires et ainsi annuler l'asymétrie membranaire. De nombreuses études ont montré que la libération des MPs est déclenchée par une augmentation de la concentration cytosolique du calcium (Pasquet et al., 1996; Neri et al., 2012). L'augmentation du calcium intracellulaire aura comme effet la modification de l'équilibre d'enzymes membranaires qui contrôlent l'asymétrie de répartition

des phospholipides. Une concentration élevée en calcium régule positivement la scramblase et bloque la coopération entre la translocase et la floppase. Ceci conduit à une perte de l'asymétrie membranaire et l'externalisation de la PS, qui va déstabiliser la conformation de la bicouche lipidique et induire le bourgeonnement et la libération des MPs (**Figure 11**).

## **2- La réorganisation du cytosquelette cellulaire: dégradation et contraction:**

L'augmentation du calcium intracellulaire provoque l'activation d'enzymes protéolytiques, telles que la calpaïne ou la gelsoline, responsables de la dégradation du cytosquelette cellulaire nécessaire à la libération des MPs (Miyoshi et al., 1996). Le bourgeonnement et la libération des MPs dans l'espace extracellulaire, nécessite une force de contraction générée par l'interaction actine-myosine du cytosquelette cellulaire. Ce processus est contrôlé par l'activation des kinases et l'inhibition des phosphatases. Il s'agit des Rho A GTPase, la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK), et des « Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 et 2 » (ROCK I et II) responsable de la réorganisation du cytosquelette (Kunzelmann et al., 2004). Par exemple, au cours de l'apoptose, le bourgeonnement des MPs est associé à l'activation de la ROCK I par la caspase-3. À son tour, ROCK I phosphoryle divers substrats dont la MLCK qui à son tour phosphoryle la chaîne légère de la myosine permettant ainsi l'interaction actine-myosine, contraction du cytosquelette et bourgeonnement des MPs (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001). Egalement, il a été mis en évidence que le flux calcique peut aussi activer les protéines tyrosine kinase et la voie ERK, aboutissant au final à la contraction du cytosquelette cellulaire et la libération des MPs (Heemskerk et al., 1997; Neri et al., 2012).

Indépendamment du calcium, il existe d'autres mécanismes impliqués dans la formation des MPs. Ainsi, il a été démontré que les plaquettes non stimulées et qui présentent une activité minimale de la calpaïne sont capables de produire des MPs par un mécanisme impliquant une désorganisation du cytosquelette d'actine et un renouvellement de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ .

En outre, il a été mis en évidence que l'activation de la protéine kinase A (PKA) joue un rôle dans la formation des MPs via un mécanisme impliquant l'activation de la calpaïne (Cauwenberghs et al., 2006; Yan et al., 2009). Enfin, un mécanisme intermédiaire, entre l'activation cellulaire et l'apoptose a été rapporté. En effet, en absence de mort cellulaire, la stimulation des cellules endothéliales avec de la thrombine conduit à la libération des MPs via l'activation de la voie Rho-A/ROCK II et de la caspase-2 (Sapet et al., 2006) (**Figure 11**).

## **V- Mécanisme d'interaction entre les MPs et les cellules cibles:**

Actuellement, quatre mécanismes de transfert d'information biologique entre les MPs et les cellules cibles ont été décrits: une interaction ligand-récepteur, un transfert de contenu des MPs, fusion et/ou internalisation des MPs dans les cellules cibles (**Figure 11**).

### **a. Interaction ligand-récepteur:**

Les MPs pourraient interagir avec la cellule cible en activant un récepteur membranaire permettant ainsi l'activation de différentes voies de signalisation cellulaire. Dans notre laboratoire, nous avons montré que les MPs isolées à partir des patients souffrant de SM sont porteuses de Fas ligand responsable d'une hyporéactivité vasculaire *via* l'interaction avec son récepteur Fas localisé à la surface des cellules musculaires lisses (Agouni et al., 2011). En outre, certains types de MPs portent le morphogène Shh, en se liant à son récepteur localisé à la membrane des cellules endothéliales, induisent la production du NO, l'angiogenèse, et corrigent la dysfonction endothéliale lors d'une ischémie cardiaque (Agouni et al., 2007; Soleti et al., 2009; Benameur et al., 2010).

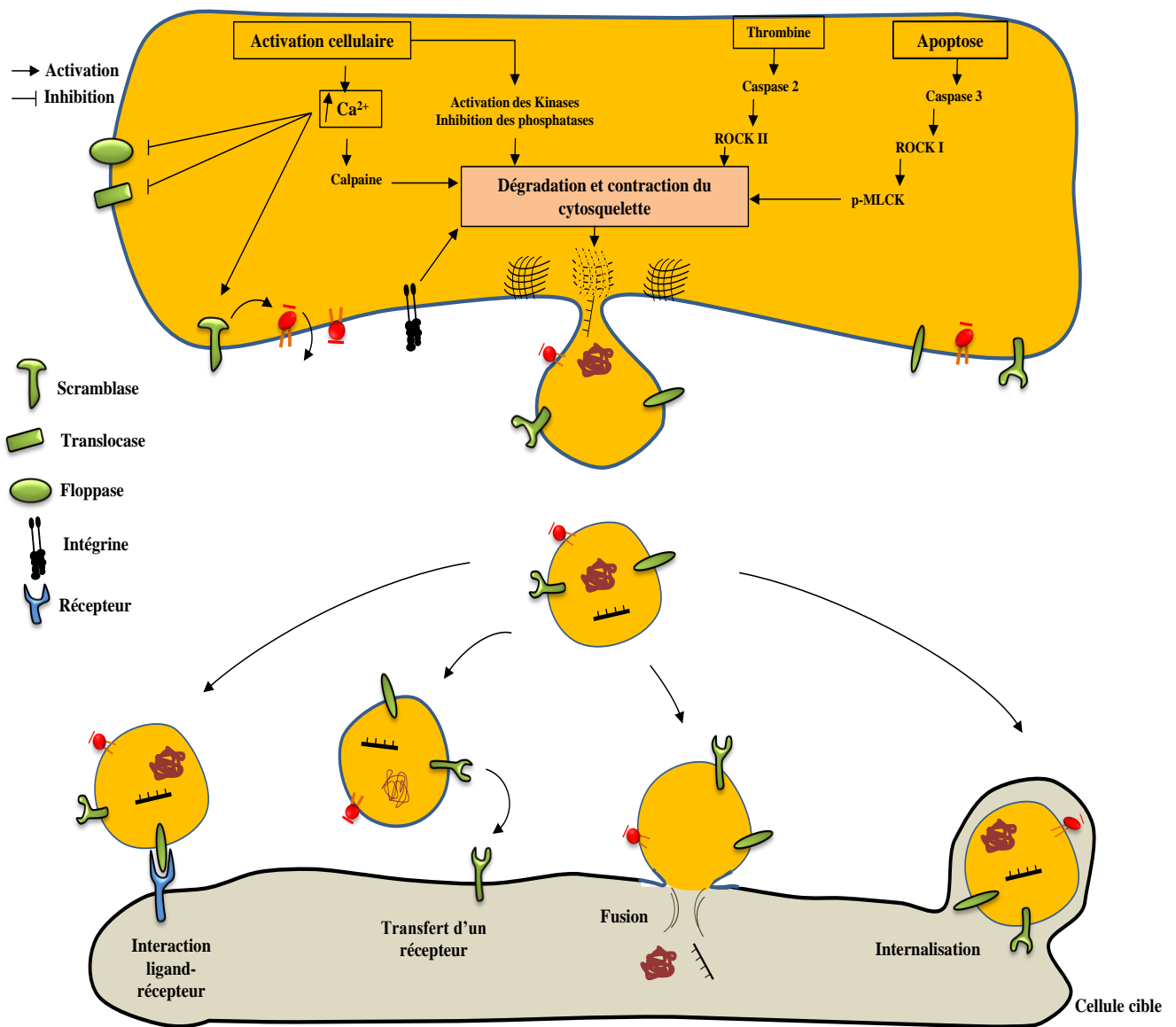
### **b. Transfert des composants:**

Les MPs pourraient aussi transférer directement une partie de leur contenu à la cellule receveuse, conduisant à une modification phénotypique et la reprogrammation des fonctions

cellulaires. Ce transfert peut être facilité par les interactions transitoires entre les MPs et la cellule cible. Mack et al (2000) ont démontré que les MPs porteuses du CCR5, récepteur de chimiokine, peuvent transférer ce récepteur aux cellules mononuclées du sang périphérique et les rendre CCR5 positive. Ces chercheurs ont pu détecter par cytométrie en flux ce récepteur sur la surface des monocytes et des lymphocytes CCR5 négative après une co-incubation avec les MPs porteuses de CCR5. Le transfert du récepteur CCR5 par les MPs favoriserait la liaison et l'internalisation des particules virales du virus VIH, dévoilant ainsi un nouveau mécanisme d'infection tissulaire. De même, les MPs dérivées du gliome agressif pourraient transférer une forme oncogénique tronquée du récepteur EGFR VIII, à des cellules tumorales exprimant un récepteur de type sauvage. Cela se traduit par la propagation de la tumeur et la modulation de ces propriétés prolifératives (Al-Nedawi et al., 2008).

### **c. Fusion et internalisation:**

Enfin, les MPs peuvent fusionner ou être internalisées par la cellule cible. Il a été mis en évidence que la fusion des MPs dérivées des macrophages matures avec la membrane plasmique des monocytes permet leur différenciation en macrophages par un mécanisme qui fait intervenir le transfert du miR-223 porté par les MPs (Ismail et al., 2013). Ainsi, suite à une stimulation avec du LPS, les monocytes transfèrent le FT aux plaquettes activées à travers de la fusion des MPs (Breimo et Østerud., 2005). D'autre part, nous avons montré que l'internalisation des MPs générées in vitro à partir des lymphocytes T humains protège les cellules endothéliales contre l'apoptose, en partie, par une diminution des ROS cytosoliques et par le transfert des enzymes antioxydants tel que la catalase et la superoxyde dismutase (Soleti et al., 2012).



**Figure 11: Mécanismes de formation des MPs et modes d'interaction avec les cellules cibles.** D'après Tual-Chalot et al, 2011. La formation des MPs est le résultat d'une désorganisation du cytosquelette et une perte de l'asymétrie membranaire suite à une activation cellulaire ou bien apoptose. Une fois produites, elles interagissent avec la cellule cible soit par une interaction ligand-récepteur, transfert d'un récepteur, fusion ou internalisation complète de la MP. P-MLCK, myosin light chain kinase phosphorylée; ROCKI, Rho-associated protein kinase1; ROCKII, Rho-associated protein kinase 2.

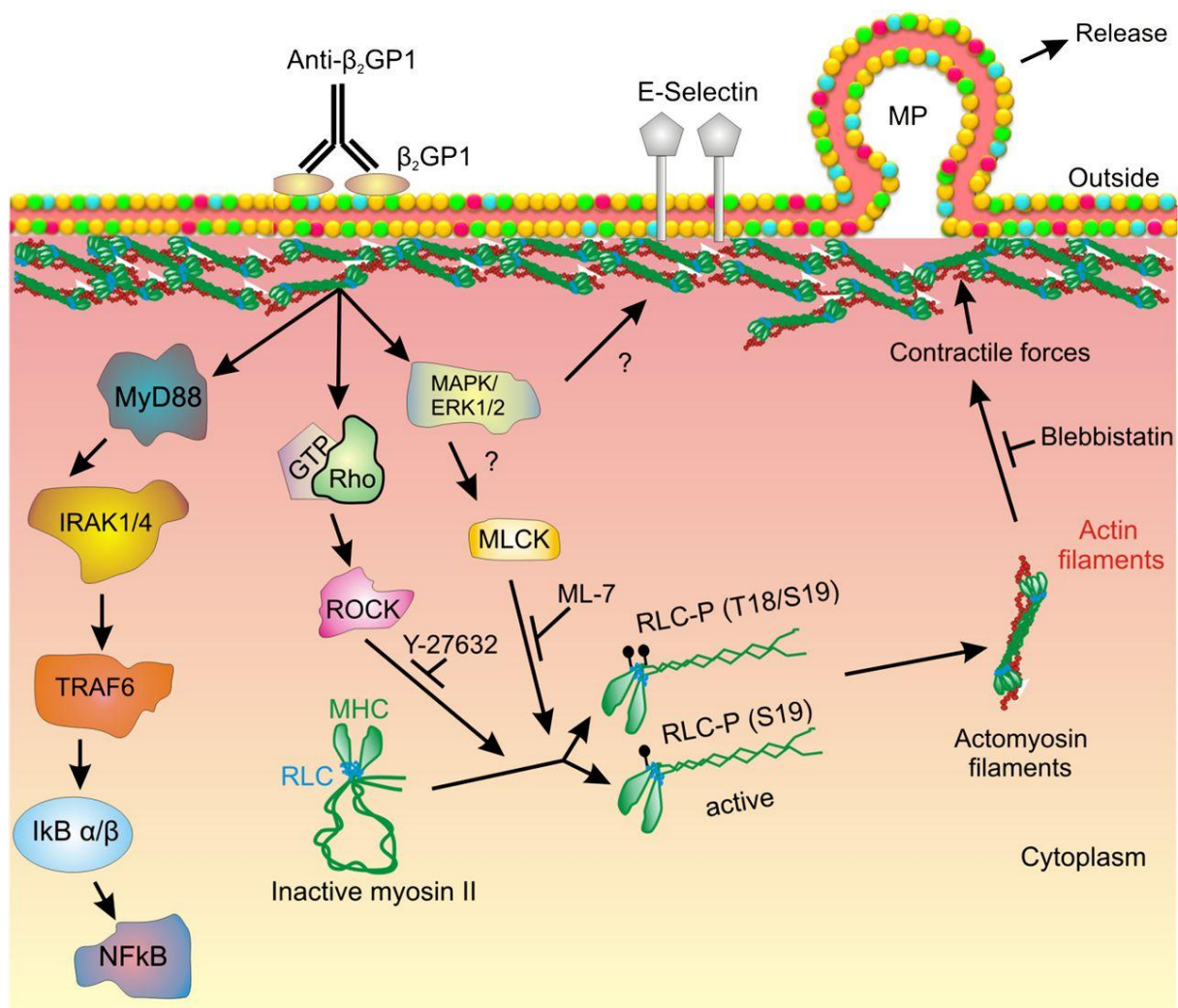


## **VI- Rôle de MLCKnm dans la libération des MPs:**

Récemment, des études réalisées sur le syndrome des antiphospholipides ont permis de dévoiler le rôle de MLCKnm dans la libération des MPs endothéliales (**Figure 12**).

Le syndrome des antiphospholipides est caractérisé par la présence chez les patients des anticorps dirigés contre la  $\beta_2$ -glycoprotéine 1 ( $\beta_2$ GP1), protéine de liaison des phospholipides membranaires. Il a été montré que ces anticorps anti- $\beta_2$ GP1 favorisent la thrombose en induisant la libération des MPs procoagulantes suite à un remodelage du cytosquelette cellulaire via l'activation de MLCKnm et une phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. En parallèle, une augmentation de l'expression par les cellules endothéliales des molécules d'adhésion telle que: E-sélectine, I-CAM et V-CAM, ainsi que l'ARN messager du facteur tissulaire a été observée. Le traitement par le ML-7, inhibiteur pharmacologique de l'activité kinase de MLCKnm, diminue significativement la libération des MPs sans affecter l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (Betapudi et al., 2013).

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'activité de MLCKnm peut fournir une nouvelle approche afin d'inhiber la libération des MPs par les cellules endothéliales.



**Figure 12: Schéma montrant les mécanismes impliqués dans la physiopathologie du syndrome des antiphospholipides: rôle de MLCKnm dans la libération des MPs endothéliales.** D'après Betapudi et al, 2013. anti- $\beta_2$ GP1, anticorps anti  $\beta_2$ -glycoprotéine 1; ML-7, inhibiteur de MLCKnm; Y-27632, inhibiteur de ROCK; Blebbistatine, inhibiteur du bourgeonnement cellulaire à haute affinité pour la myosine II.

Après interaction avec la cellule cible, les MPs peuvent moduler plusieurs fonctions cellulaires participant ainsi à l'homéostasie cardiovasculaire (Ratajczak et al., 2006; Deregibus et al., 2007).

## **VII- Rôle des MPs en physiologie et physiopathologie cardiovasculaire:**

Les MPs sont considérées comme des effecteurs cellulaires susceptibles de moduler de nombreuses fonctions biologiques. Leur rôle en physiologie et physiopathologie cardiovasculaire est fortement étudié.

### **a. Rôle en physiologie cardiovasculaire:**

Les MPs sont détectables dans le sang des sujets sains. Elles peuvent participer à la coagulation sanguine et la réparation tissulaire. Par exemple, pendant le processus de coagulation, la fonction principale des plaquettes est l'assemblage des protéines de coagulation et la formation du réseau de fibrine dans le bouchon hémostatique (Tans et al., 1991). Cependant, l'activité pro-coagulante des MPs plaquettaires est environ 50 - à 100 fois plus élevée que celle des plaquettes activées et cela est expliqué par la présence du PS, CD61, CD62P et le facteur X sur la membrane des MPs (Sinauridze et al., 2007). En ce qui concerne la réparation des tissus, les MPs peuvent participer au développement d'un réseau de vaisseaux sanguins au cours de processus de cicatrisation. En effet, les MPs porteuses de PPAR alpha favorisent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins via la différenciation des progéniteurs endothéliaux (Benameur et al., 2010). Ensemble, ces données mettent en évidence les effets potentiels des MPs dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire **(Figure 13)**.

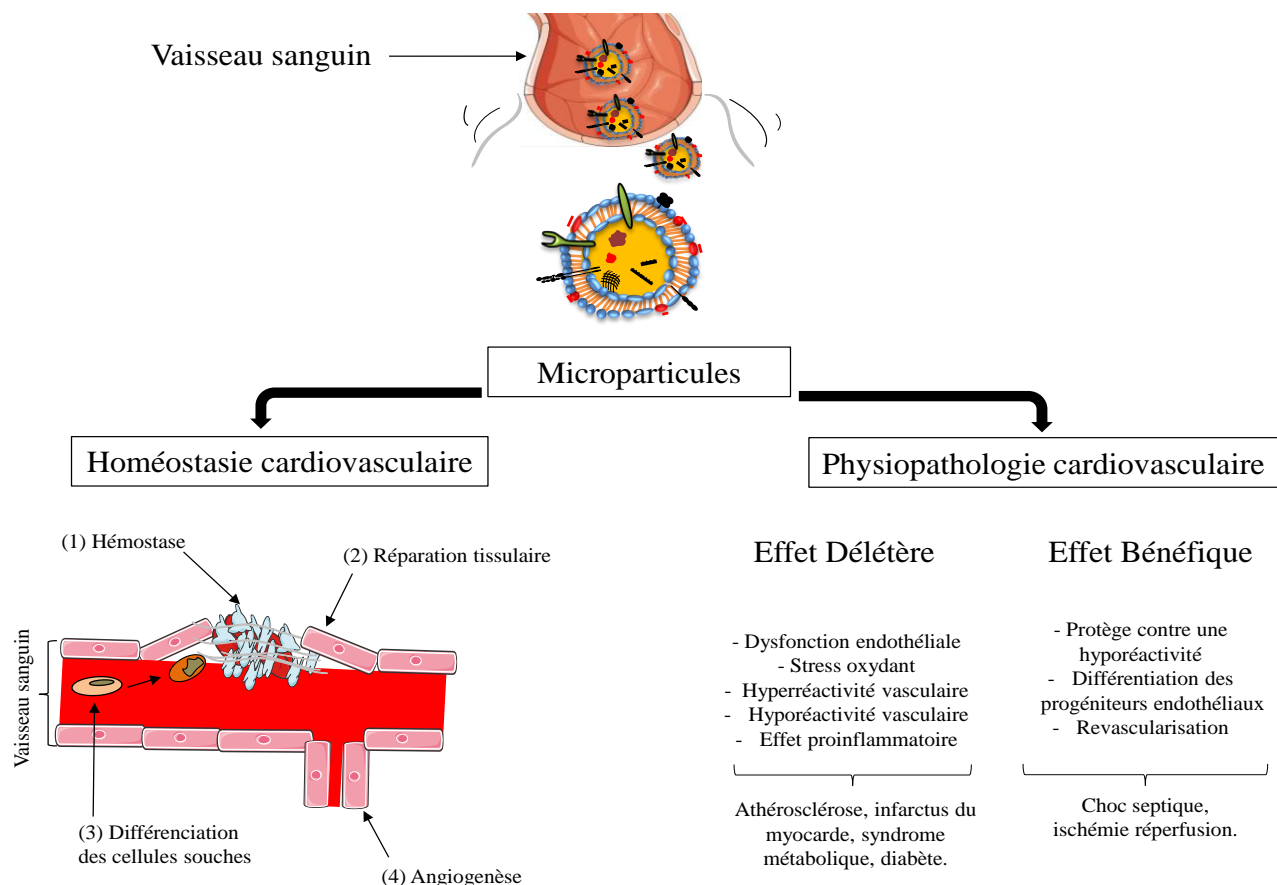
## **b. Rôle en physiopathologie cardiovasculaire:**

Des études ont montré que le phénotype et le taux des MPs circulantes sont altérés dans différentes maladies à risque cardiovasculaire telles que le syndrome métabolique (SM), syndrome d'apnée hypopnée obstructive du sommeil (SAHOS), et l'hypertension artérielle pulmonaire (Agouni et al., 2008; Priou et al., 2010; Tual-Chalot et al., 2010). En effet, des niveaux élevés du nombre total ou du nombre de certains types de MPs ont été détectés au niveau des nombreuses maladies cardiovasculaires et ils sont souvent corrélés à la sévérité de la pathologie (Mallat et al., 2000; Boulanger et al., 2001; Sabatier et al., 2002; Nomura et al., 2002; Meziani et al., 2006; Agouni et al., 2008). Par exemple, le nombre total ainsi que le niveau des MPs issues des plaquettes, érythrocytes et les cellules endothéliales est augmenté chez les personnes atteintes du SM par rapport aux sujets sains (Agouni et al., 2008). Cependant, les patients atteints du SAHOS présentent le même niveau de MPs circulantes que les sujets sains, mais le niveau des MPs granulocytaires (CD66b+) et dérivées des leucocytes activés (CD62L+) sont plus élevés chez les patients SAHOS. Toutefois, il existe une corrélation positive entre le nombre de MPs CD62L+ et la dysfonction endothéliale observée chez les patients SAHOS (Priou et al., 2010). Ces résultats augmentent l'intérêt de l'utilisation des MPs en tant que «biomarqueurs», facilement accessible via la circulation générale, dans le diagnostic et le pronostic des maladies cardiovasculaires.

D'une autre part, les MPs sont désormais considérées comme «bioeffecteurs» dans les maladies cardiovasculaires. Au cours de l'athérogenèse, il a été mis en évidence que les MPs accélèrent la progression de la lésion vasculaire en favorisant une dysfonction endothéliale, une néovascularisation de la plaque et une augmentation de la thrombogénicité par un mécanisme impliquant CD40 porté par les MPs (Leroy et al., 2008). De plus, plusieurs groupes ont proposé que les MPs circulantes des patients atteints d'infarctus du myocarde, de diabète, de pré-éclampsie, de SM ou SAHOS induisent une dysfonction endothéliale par une

réduction de l'activité de NO synthase endothéliale et/ou par diminution de la biodisponibilité du NO (Boulanger et al., 2001; Vanwijck et al., 2002; Martin et al., 2004; Tesse et al., 2007; Priou et al., 2010), par une augmentation de la nitration des protéines endothéliales (Agouni et al., 2008) ainsi que le stress oxydatif (Helal et al., 2010). Enfin, les MPs peuvent participer à la régulation du tonus vasculaire en affectant la cellule endothéliale. En effet, dans diverses pathologies comme le diabète et l'hypertension artérielle, les MPs ont été impliquées dans l'induction d'une dysfonction endothéliale et/ou hypo-réactivité vasculaire en réponse à des agonistes (Sabatier et al., 2002; Colle et al., 2004; Martinez et al., 2005). Ensemble, ces données mettent en évidence les effets délétères des MPs sur le système cardiovasculaire, et en particulier sur les cellules endothéliales.

Tout de même, les MPs peuvent avoir des effets bénéfiques. Ainsi, il a été mis en évidence que l'ischémie de la patte chez la souris augmente la production des MPs qui vont induire la différenciation des progéniteurs endothéliaux, et favoriser ainsi la revascularisation post-ischémique par un mécanisme impliquant la NADPH oxydase (Leroyer et al., 2009) (**Figure 13**).



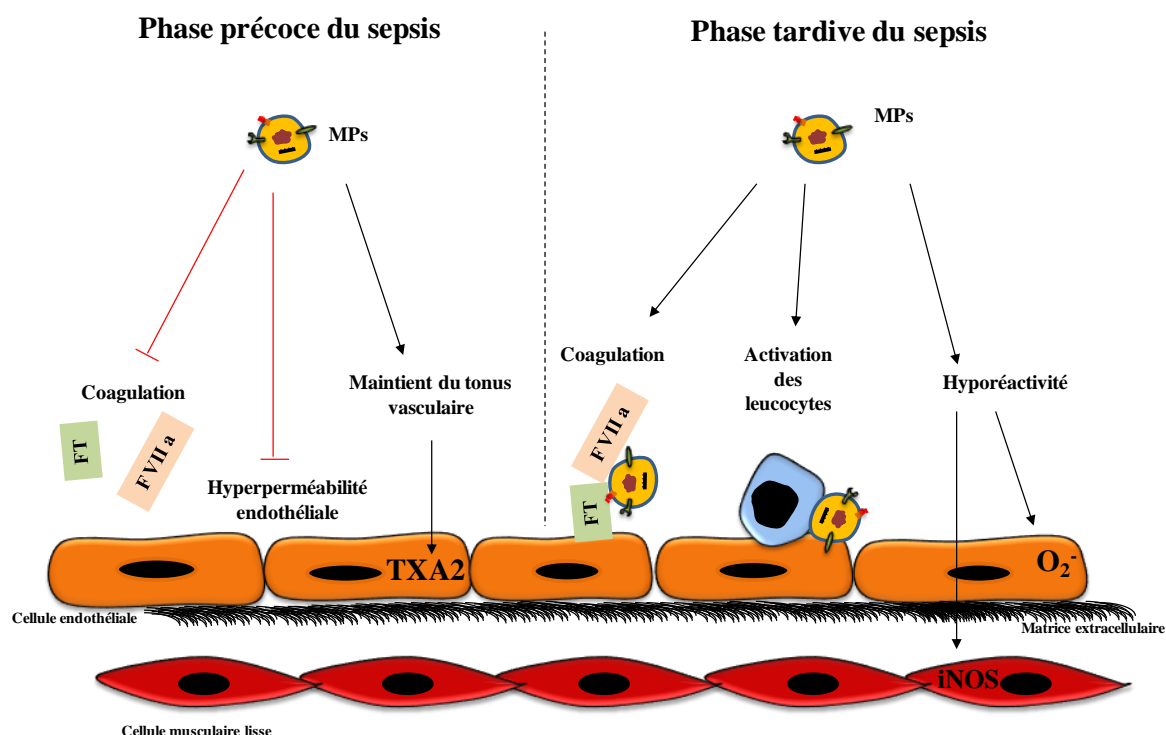
**Figure 13: Rôle des MPs en homéostasie et en physiopathologie cardiovasculaire.** Les MPs peuvent participer à l'hémostase, la réparation tissulaire, l'angiogenèse et la différenciation des cellules souches. Les MPs sont considérées comme un bioeffecteurs à double effet (bénéfique ou délétère) dans les maladies cardiovasculaires.

Concernant la physiopathologie du sepsis, le rôle des MPs est très largement discuté.

### VIII- Rôle des MPs dans l'évolution du sepsis:

Un niveau élevé de MPs circulantes, d'origine plaquettaire, granulocytaire et endothéliale a été identifié chez les patients atteints du choc septique (Nieuwland et al., 2000). Ces MPs exercent des effets pléiotropes et différentielles; elles peuvent être bénéfique dans le sepsis précoce et délétère dans le sepsis tardif (choc septique).

Concernant les effets délétères, il a été mis en évidence que les MPs plaquettaires et granulocytaires participent à la thrombose microvasculaire chez les patients septiques. Ces MPs ont des effets pro-coagulants en augmentant la génération de la thrombine via un mécanisme dépendant du facteur tissulaire VIIa (Nieuwland et al., 2000). D'autre part, les MPs d'origines endothéliale activent les leucocytes en favorisant l'adhésion à l'endothélium vasculaire et la migration vers le foyer inflammatoire (Ogura et al., 2004). Ainsi, les MPs dérivées des leucocytes activées peuvent jouer un rôle dans l'inflammation vasculaire en produisant une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium, nécessaire à l'activation et le recrutement des cellules inflammatoires (Fujimi et al., 2002). Des études in vitro ont montré que les MPs de patients septiques induisent la production des espèces réactives d'oxygène (ERO) et l'apoptose des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses via l'activation de la NADPH oxydase (Janiszewski et al., 2004; Gambim et al., 2007). Ainsi, l'injection des MPs isolées à partir des rats septiques dans des rats normaux, induit une augmentation de la production de l'anion superoxyde, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, et une expression accrue de la NOS inductible au niveau de la paroi vasculaire. Cette inflammation vasculaire favorise une dysfonction endothéliale suivie par un défaut de la perfusion tissulaire et une dysfonction d'organes (Mortaza et al., 2009) (**Figure 14**). Ces données montrent que les MPs participent à la physiopathologie du sepsis partant de l'inflammation jusqu'à la défaillance d'organes.



**Figure 14: Rôle des MPs dans le sepsis.** D'après Reid et al., 2012. FT, facteur tissulaire; FVIIa, facteur tissulaire VIIa; TXA2, thromboxane A2;  $O_2^-$ , anion superoxyde; iNOS, NO synthase inducible.

Inversement à ces observations, plusieurs études montrent que les MPs des patients septiques peuvent avoir des effets bénéfiques (**Figure 14**). De manière surprenante, nous avons montré que les MPs des patients septiques protègent contre l'hyporéactivité vasculaire induite par le LPS et améliorent la sensibilité de la contraction en réponse à la sérotonine. Cet effet est associé à l'augmentation de la production d'un agent vasoconstricteur qui est la thromboxane A2 (TXA2) (Mostefai et al., 2008). Ce mécanisme est important au début de la phase du choc septique en compensant l'hyporéactivité vasculaire associé à l'hypotension (Laher et al., 2011). De plus, il a été montré que les MPs d'origine endothéliale réduisent la coagulation, l'apoptose et la perméabilité endothéliale (Pérez-Casal et al., 2005). Ces MPs portent l'activateur de la protéine C (APC) un inhibiteur physiologique de la coagulation (Pérez-Casal et al., 2009). L'interaction entre l'APC porté par les MPs et son récepteur protéase-activated



receptor-1 (PAR-1) exprimé à la surface des cellules endothéliales entraîne des effets anticoagulants, anti-inflammatoires et cytoprotecteurs (Pérez-Casal et al., 2011). Ces résultats montrent que des niveaux élevés de MPs dans le sepsis précoce peuvent protéger contre la réponse inflammatoire systémique. En effet, l'implication des MPs dans la modulation du statut inflammatoire est clairement établie. Les MPs peuvent avoir des effets pro et/ou anti inflammatoires.

## **IX- MPs comme modulateurs de la réponse inflammatoire:**

### **a- Effets pro-inflammatoires:**

Les MPs circulantes sont considérées comme des nouveaux acteurs au niveau de l'inflammation vasculaire observée dans plusieurs pathologies cardiovasculaires, y compris l'infarctus aigu du myocarde, le diabète, l'athérosclérose, la pré-éclampsie, l'hypertension et le SM. Ainsi, nous avons montré récemment que, chez la souris, l'injection des MPs des patients souffrant du SM augmente la sécrétion de MCP-1 (chimiokine des cellules inflammatoires) au niveau de l'aorte et ceci est associé à une hyporéactivité vasculaire (Agouni et al., 2011). Cet effet a été supprimé après la neutralisation du ligand proinflammatoire Fas porté par les MPs, indiquant l'importance de cette voie de signalisation dans l'inflammation induite par les MPs.

Il a été mis en évidence que les MPs circulantes des patients atteintes du SAHOS ou de pré-éclampsie augmentent l'expression du COX-2 pro-inflammatoire dans les cellules endothéliales humaines (Priou et al., 2010) et dans l'aorte de souris (Meziani et al., 2006). Dans l'athérosclérose, il a été montré que les MPs favorisent la réponse inflammatoire nécessaire à la progression de la plaque d'athérome. En effet, les MPs augmentent l'expression des molécules d'adhésion telle qu'ICAM-1 sur les cellules endothéliales et recrutent les cellules inflammatoires à savoir les monocytes sans que le niveau d'IL-6, IL-8, MCP-1 ne soit affecté (Rautou et al., 2011). De plus, l'équipe de Weber a largement étudié le

rôle des MPs générées à partir des plaquettes au cours de l'athérosclérose. Ils ont montré que ces MPs entraînent l'activation de l'endothélium par un transfert du chimiokine (RANTES) en favorisant ainsi le recrutement des monocytes dans la plaque d'athérome (Mause et al., 2005).

Enfin, Mesri et Altieri (1998, 1999), ont montré que les MPs dérivées des neutrophiles sont des stimulateurs efficaces de production des cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6, IL-8, MCP-1 par les cellules endothéliales humaines. Dans le système monocyte/macrophage humain, les MPs dérivées des monocytes exercent une activation autocrine sur d'autres monocytes, en induisant l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, la production de l'anion superoxyde et des cytokines pro-inflammatoires (Bardelli et al., 2012).

#### **b- Effets anti-inflammatoires:**

Enfin, certains types de MPs possèdent des effets anti-inflammatoires et jouent un rôle important au cours de la résolution de l'inflammation. Les polynucléaires neutrophiles humains produisent des MPs qui sont capables de réduire la réponse inflammatoire médiée par les macrophages en réponse au LPS. Ces effets anti-inflammatoires pourraient être médiés par l'annexine A1 puisque les MPs dérivées des neutrophiles déficientes en annexine A1 n'ont pas d'effet (Dalli et al., 2008). Ces résultats suggèrent que dès le premier stade de l'inflammation, les MPs fournissent un environnement anti-inflammatoire nécessaire à sa résolution (Gasser et Schifferli., 2004).

D'autres auteurs ont montré que les MPs libérées par les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en apoptose peuvent limiter le développement de l'athérosclérose. En effet, ces MPs expriment abondamment le miRNA-126, responsable de l'augmentation de la production de la chimiokine CXCL-12, ce qui permet le recrutement des cellules progénitrices, nécessaire à la réparation tissulaire et le maintien de la stabilité de la plaque d'athérome (Zernecke et al., 2009).

**Conclusion:**

Les MPs représentent actuellement une partie intégrante de la physiologie et la physiopathologie des maladies cardiovasculaires ouvrant ainsi un nouveau domaine de recherche. Durant le sepsis, les MPs portent un message bénéfique afin de protéger contre l'hyporéactivité vasculaire pendant la phase précoce du choc septique (Mostefai et al., 2008). Pendant la phase tardive de la maladie, les MPs portent un message délétère prothrombotique et pro-inflammatoire qui participe à la défaillance d'organe.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est de générer des MPs avec plus d'effets bénéfiques que délétaires dans le sepsis et cela dans l'optique d'utiliser ces MPs comme une nouvelle stratégie de lutte contre l'inflammation excessive rencontrée dans le choc septique et autres pathologies inflammatoires.

## **BUT DE LA THESE**

L'objectif général de ce travail de thèse était de déterminer d'une part le rôle de l'isoforme MLCKnm dans le mécanisme de libération et de bourgeonnement des MPs circulantes, et d'autre part, d'évaluer les conséquences de la délétion de MLCKnm sur les effets des MPs sur les cellules cibles.

Lors des affections inflammatoires, l'activation des cellules entraîne la libération de MPs, pouvant agir comme des vecteurs d'informations biologiques entre les cellules. Durant le sepsis, les MPs peuvent avoir des effets bénéfiques et/ou délétères. De ce fait, nous nous sommes intéressés à chercher une nouvelle stratégie pour orienter le message biologique porté par les MPs vers le sens bénéfique.

De nombreuses données dans la littérature décrivent qu'une délétion totale de MLCKnm est protectrice contre l'inflammation systémique dans plusieurs modèles expérimentaux chez la souris. Il a été montré que les souris Knock-out (KO) MLCKnm traitées par du LPS présentent une amélioration de la courbe de survie par rapport aux souris sauvages suite à une résistance à l'inflammation vasculaire par une diminution de l'hyperperméabilité endothéliale, d'infiltration cellulaire et de la signalisation inflammatoire (Ralay Ranaivo et al., 2007).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à évaluer en première partie de ce travail les conséquences de la délétion de MLCKnm sur le taux circulant, l'origine cellulaire, les propriétés physiques des MPs ainsi que le nombre des cellules circulantes. En deuxième partie, nous nous sommes consacrés à l'étude des effets des MPs issues de souris sauvages et déficientes en MLCKnm sur les cellules cibles.

## **RESULTATS EXPERIMENTAUX**

**Etude du rôle de l'isoforme non musculaire de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCKnm) dans les propriétés phénotypiques et inflammatoires des microparticules circulantes**

**Mémoire:**

Non-muscle myosin light chain kinase is critical for microvesicle-induced inflammation by endotoxin.

Soumis dans *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.

## **Introduction et but de l'étude**

Le sepsis est défini comme la réponse inflammatoire systémique à l'infection. Il est représenté par un état infectieux grave associant une thrombose microvasculaire, une hyporéactivité vasculaire et une dysfonction endothéliale entraînant une défaillance d'organes (Annane et al., 2005). Récemment, plusieurs études se sont intéressées à MLCKnm comme une nouvelle cible thérapeutique pour réduire l'inflammation vasculaire. Lors du choc endotoxique, Ralay Ranaivo et al (2007) ont montré que la délétion de MLCKnm améliore la survie des souris, protège contre l'hyporéactivité vasculaire, réduit l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, ainsi que le stress oxydant et nitrosant, suggérant un rôle protecteur de la délétion de MLCKnm. De ce fait, MLCKnm représente une cible moléculaire potentielle dans les pathologies inflammatoires.

Dance ce contexte, le but de cette étude est :

- 1) D'évaluer l'effet de la délétion de MLCKnm sur le taux circulant, l'origine cellulaire, les propriétés physiques des MPs circulantes (vecteur de transfert d'information biologique entre les cellules) ainsi que le nombre des cellules circulantes productrices des MPs.
- 2) D'évaluer les conséquences de la délétion de MLCKnm sur les effets des MPs circulantes sur les cellules cibles. On analysant l'effet des MPs dérivées des souris déficientes en MLCKnm, sur l'inflammation vasculaire et la dysfonction endothéliale dans des conditions contrôles et en présence du LPS (choc septique).



# **MODELE ANIMAL ET CELLULAIRE**

## **1- Souris knock-out MLCKnm (KO MLCKnm):**

Notre travail a été réalisé sur des souris mâles C57BL/6 âgées de 8 semaines, présentant un phénotype sauvage MLCKnm+/+ ou une délétion totale de MLCKnm (MLCKnm-/-) générée par une technique de ciblage sélectif de l'exon d'intérêt (Wainwright et al., 2003). Toutes les procédures de soins et de traitement des animaux ont été réalisées conformément aux protocoles institutionnels approuvés par le Comité Français de Protection des Animaux et en conformité avec la réglementation européenne (CEEa.PdL2012.94).

La délétion totale chez la souris de MLCKnm n'affecte pas les paramètres cardiovasculaires, à savoir la pression artérielle, la fréquence cardiaque, la taille de la cavité cardiaque, la contractilité, et l'électrocardiogramme (ECG). En revanche, MLCKnm joue un rôle dans la libération des facteurs endothéliaux en réponse au flux dans les artères de résistance sans affecter la réponse aux agents vasoconstricteurs ou vasodilatateurs dans les vaisseaux de conductances tels que l'aorte. Ces résultats sont interprétés par l'existence d'un mécanisme compensateur qui masque les effets de la délétion de cette kinase (Ohlmann et al., 2005).

Wainwright et al (2003) ont montré que les souris knock-out pour MLCKnm, sont moins sensibles aux lésions pulmonaires aiguës induites par l'endotoxine et elles présentent une amélioration au niveau de la courbe de survie, suggérant un effet protecteur de la délétion de MLCKnm. Récemment, nous avons montré que la délétion de MLCKnm améliore la survie des souris après une injection intrapéritonéale du LPS (choc septique) ou une ligature du cæcum (inflammation systémique). L'hyporéactivité vasculaire induite par le LPS aux agents vasoconstricteurs a été complètement prévenue dans l'aorte des souris KO MLCKnm. Le mécanisme cellulaire à l'origine de ces effets est associé à une diminution de l'inflammation vasculaire par une réduction de l'expression de NF- $\kappa$ B, du stress nitrosant (iNOS) et oxydant ( $O_2^-$ ). En outre, dans les organes des souris KO MLCKnm il est observé une chute de la production de NO induite par le LPS ce, qui a été corrélée avec une diminution de

l'expression de l'iNOS (Ralay Ranaivo et al., 2007). Ces résultats ouvrent des nouvelles perspectives dans le domaine thérapeutique afin de concevoir des nouvelles stratégies de lutte contre les maladies inflammatoires, sur la base de l'inhibition pharmacologique de MLCKnm. Ce modèle animal de souris MLCKnm<sup>-/-</sup> fournit une vision globale de la fonction de MLCKnm dans la physiopathologie des maladies inflammatoires et représente la base de plusieurs études scientifiques focalisant à développer un nouvel outil thérapeutique pour lutter contre l'inflammation systémique.

## **2- Cellules primaires: cellules endothéliales d'aorte de souris**

Les cellules utilisées étaient des cellules endothéliales d'aorte thoracique de souris MLCKnm<sup>+/+</sup> et MLCKnm<sup>-/-</sup>. La méthode d'extraction a été adaptée à partir du protocole de Kobayashi et al. (2005). Brièvement, après anesthésie de la souris à l'isoflurane, une incision thoracique était pratiquée afin d'exposer le cœur et les poumons. L'aorte thoracique était alors isolée et immergée dans une solution de «dulbecco's modified eagle's medium» (DMEM, Lonza, Walkersville, Etats-Unis) contenant 20 % de sérum de veau foetal (SVF, Lonza). Une canule de 24 gauges était alors insérée et attachée au niveau proximal de l'aorte afin de permettre le lavage de la lumière avec du DMEM. Le niveau distal était alors ligaturé et une solution de collagénase de type II (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) à 2 mg/ml était perfusée. Après 45 minutes d'incubation à 37°C, les cellules endothéliales étaient décollées avec une solution de DMEM 20% SVF. Ensuite, elles étaient récupérées par une centrifugation (1.200 g, 5 minutes) et le culot resuspendu dans une solution de DMEM 20 % SVF.

Les cellules étaient cultivées par la suite dans un puits de 9,6 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated, New-York, Etats-Unis), et après 2 heures d'incubation à 37°C, le milieu était remplacé par le milieu de culture «endothelial basal cell medium-2» 5 % SVF (EBM-2, Lonza). Le milieu de

culture a été changé tous les deux jours. Une fois à confluence, les cellules étaient repiquées dans une flask de 25 cm<sup>2</sup> pour les amplifier jusqu'au 2<sup>ème</sup> passage.

La complexité de la méthode d'extraction, sa faible rentabilité ainsi que la longue durée de la culture cellulaire (3 semaine pour que les cellules arrivent à confluence), représentent les points négatifs de l'utilisation de ce type cellulaire.



# **Non-muscle myosin light chain kinase is critical for microvesicle-induced inflammation by endotoxin**

Abderahim Gaceb, Luisa Vergori, M. Carmen Martinez, Ramaroson Andriantsitohaina

From INSERM U1063, Université d'Angers, Angers, F-49100 France

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Dr. Ramaroson Andriantsitohaina, INSERM U1063, IBS, 4 rue Larrey, Angers, F-49933 France. Phone: +33 2 44 68 85 80; Fax: +33 2 44 68 85 85; e-mail: [ramaroson.andriantsitohaina@univ-angers.fr](mailto:ramaroson.andriantsitohaina@univ-angers.fr)

**Word count: 3466**

**Number of figures: 7**

**Number of references: 27**

## **Authorship Contributions**

Acquisition of data: AG; Analysis and interpretation of data: AG, CM, RA; Drafting of the manuscript: AG, CM, RA; Study concept and design: CM, RA.

**Descriptor number:** 7.08 (Inflammation: Cell-Cell Interactions)

**Sources of support:** This work is partially supported by the Région Pays de la Loire (CIMATH-2 project), Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-BSV1-0024-01), INSERM and Université d'Angers.

**Running title:** Microvesicles and nmMLCK

**At a Glance Commentary:**

**Scientific Knowledge on the Subject:** Sepsis is a potentially life-threatening complication of an infection leading to inflammatory responses throughout the body. The current treatment of sepsis has been largely ineffective; therefore there is a significant need to develop a new strategy to fight effectively against the inflammation. Actually, we know that activation of cells leads to release microvesicles (MVs), small membrane vesicles which transport proteins and other mediators from the cell of origin to its destination. The aim of our study is to produce MVs with high anti-inflammatory properties, as new treatment to fight against inflammation in sepsis.

**What This Study Adds to the Field:** Our results provide the corner stone for using of anti-inflammatory MVs generated by deletion of non-muscle myosin light chain kinase (nmMLCK), new inflammatory protein, to reduce effectively systemic inflammation and tissue damage in sepsis and other inflammatory diseases. The strategy of gene deletion in the aim to generate beneficial MVs represents a new and promising alternative way to find new treatment in medicine to treat several disorders.

## ABSTRACT

**Rationale:** Microvesicles (MVs), small membrane vesicles released from cells, have beneficial and/or deleterious effects in sepsis. We previously reported that non-muscle myosin light chain kinase (nmMLCK) deletion protects mice against endotoxic shock by reducing inflammation.

**Objectives:** To generate beneficial MVs with high anti-inflammatory properties.

**Methods:** We evaluated the consequences of nmMLCK deletion on MVs phenotypes and their effects on mouse aortic endothelial cells in association with vascular inflammation and endothelial dysfunction during endotoxin shock induced by lipopolysaccharide.

**Measurements and Main Results:** nmMLCK deletion increased circulating levels of MVs. In nmMLCK<sup>-/-</sup> mice, platelet count was increased but the platelet ability to release MVs was reduced, and both leukocyte-derived MVs and leukocyte count were reduced. Endothelium-dependent relaxation of aorta was reduced in mice injected with MVs from nmMLCK<sup>+/+</sup> (MVs<sup>nmMLCK+/+</sup>) but not from nmMLCK<sup>-/-</sup> mice (MVs<sup>nmMLCK-/-</sup>). In presence of lipopolysaccharide, MVs<sup>nmMLCK+/+</sup> increased pro-inflammatory cytokine release by mouse aortic endothelial cells whereas MVs<sup>nmMLCK-/-</sup> enhanced anti-inflammatory secretome. Injection of MVs<sup>nmMLCK-/-</sup>, but not MVs<sup>nmMLCK+/+</sup>, prevented the increase of oxidative and nitrative stresses and reduced endothelial dysfunction in aorta from lipopolysaccharide-treated mice.

**Conclusions:** Altogether, nmMLCK plays an important role in cellular activation and release of circulating MVs. Moreover, nmMLCK deletion generates MVs with low inflammatory properties and high protective effects.

**Abstract word count: 203**

**Key words:** endothelial cell, extracellular vesicles, lipopolysaccharide, nmMLCK.



## INTRODUCTION

Sepsis is defined as a clinical syndrome characterized by a systemic inflammatory response to infection. In sepsis, activation of the coagulation system and up-regulation of inflammatory responses, lead to microvascular thrombosis, vascular hyporeactivity, and endothelial dysfunction resulting in multiple organ dysfunction (1, 2). Treatment of sepsis is still a clinical challenge in cardiovascular medicine. Actually, a new protein target has been found to protect against endotoxic shock in different experimental models of sepsis (3). This protein, the non-muscle myosin light chain kinase (nmMLCK), belongs to a family of protein kinases whose main function is to phosphorylate the 20 kDa regulatory myosin light chain (MLC-2) at Ser-19 for ATPase driven actin-myosin contraction. nmMLCK is expressed in endothelial cells, epithelium, platelets and neutrophils (4, 5). Previously, we showed that nmMLCK knockout mice have lower susceptibility to septic injury and these mice present an improving of survival curve, protection against vascular hyporeactivity, as well as nitrative and oxidative stress associated to endotoxic shock, suggesting a protective role of nmMLCK deletion (3).

Systemic inflammation is orchestrated by interactions between inflammatory cells and target cells by various means of cellular communication such as microvesicles (MVs). MVs represent a circulating reservoir of bioactive molecules displaying multiple functions (coagulation, fibrinolysis, inflammation, and angiogenesis) which are able to carry biological information. Enhanced levels of circulating MVs from platelets, granulocytes, and endothelial cells have been described in patients with meningococcal septicemia, and septic shock (6-8). MVs from septic shock patients exert pleiotropic and differential effects. Indeed, platelet- and leukocyte-derived MVs have procoagulant effects with thrombin generation occurring via a tissue factor VIIa-dependent pathway; this may account to microvascular thrombosis in septic patients (6). Conversely, we have demonstrated that MVs have a protective effect at the early phase of septic shock; thereby protecting against vascular hyporeactivity (8).

The aim of this study was to evaluate the effect of the deletion of nmMLCK on circulating MVs according to their cellular origin, and their physical properties. In addition, we investigated the actions of MVs from wild type mice (MV<sub>s</sub><sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup>) and from nmMLCK deficient mice (MV<sub>s</sub><sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>) in regulating secretome responses of endothelial cells during endotoxic shock. Administration of MV<sub>s</sub><sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> in mice activated pro-resolving pathways by significant reduction of pro-inflammatory secretome and improvement of endothelial function.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

This study was performed in male C57BL/6 8 week-old nmMLCK<sup>+/+</sup> (Wild type) and nmMLCK<sup>-/-</sup> (knockout) mice generated as previously described (9).

### **Circulating MP isolation**

Circulating MPs were isolated from peripheral blood by successive centrifugations. MPs were suspended in 0.9% NaCl saline salt solution and stored at 4°C until subsequent use. The physiological circulating concentration of MPs was used in all experiments. The physiological circulating concentration of mouse MVs was used for *in vitro* and *in vivo* studies, whereas the control conditions correspond to treatment by 0.9% NaCl.

### **Characterization of MP phenotype and size**

MP subpopulations were discriminated according to the expression of membrane specific antigens by flow cytometer. The size of circulating MPs was performed by Malvern Zetasizer (Malvern instruments, Worcestershire, England).

### **Counting of circulating cells**

Blood cell count was performed by using an automated cell count analyzer (Beckmann Coulter). The number of progenitor cells was evaluated by double labelling of circulating cells by CD133 and Sca1 markers in a flow cytometer.

#### **Platelet budding in response to thrombin *in vitro***

Platelets from mice were isolated from peripheral blood by successive centrifugations. Isolated platelets were activated by thrombin at 0.1 U/ml for 10 minutes at 37°C in presence of 0.05M of CaCl<sub>2</sub>. Platelet-derived MPs were prepared by successive centrifugations and counted by flow cytometer, as described above.

#### **Isolation of aortic endothelial cells**

Primary endothelial cells were isolated from mouse aortic (AoECs). The extraction method was adapted from the protocol of Kobayashi and colleagues (1994) (10, 11).

#### **Cytokine production**

Cytokine production was evaluated by Ray Bio Mouse Cytokine Antibody Array 3 kit. Production of IL-6 and MCP-1 was evaluated by mouse ELISA (Ray Biotech, Atlanta, GA).

#### **Endothelium function**

Endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine was assessed by myography.

#### **Data analysis**

Data were analyzed using GrapPad Prism Software (GrapPad Software, San Diego, CA). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, and *n* represents the number of mice. For experiment, statistical analyses were performed with nonparametric Mann-Whitney tests or two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures and subsequent Bonferroni post hoc tests. *P*<0.05 was considered to be statistically significant.

Additional detail on the method is provided in an online data supplement.

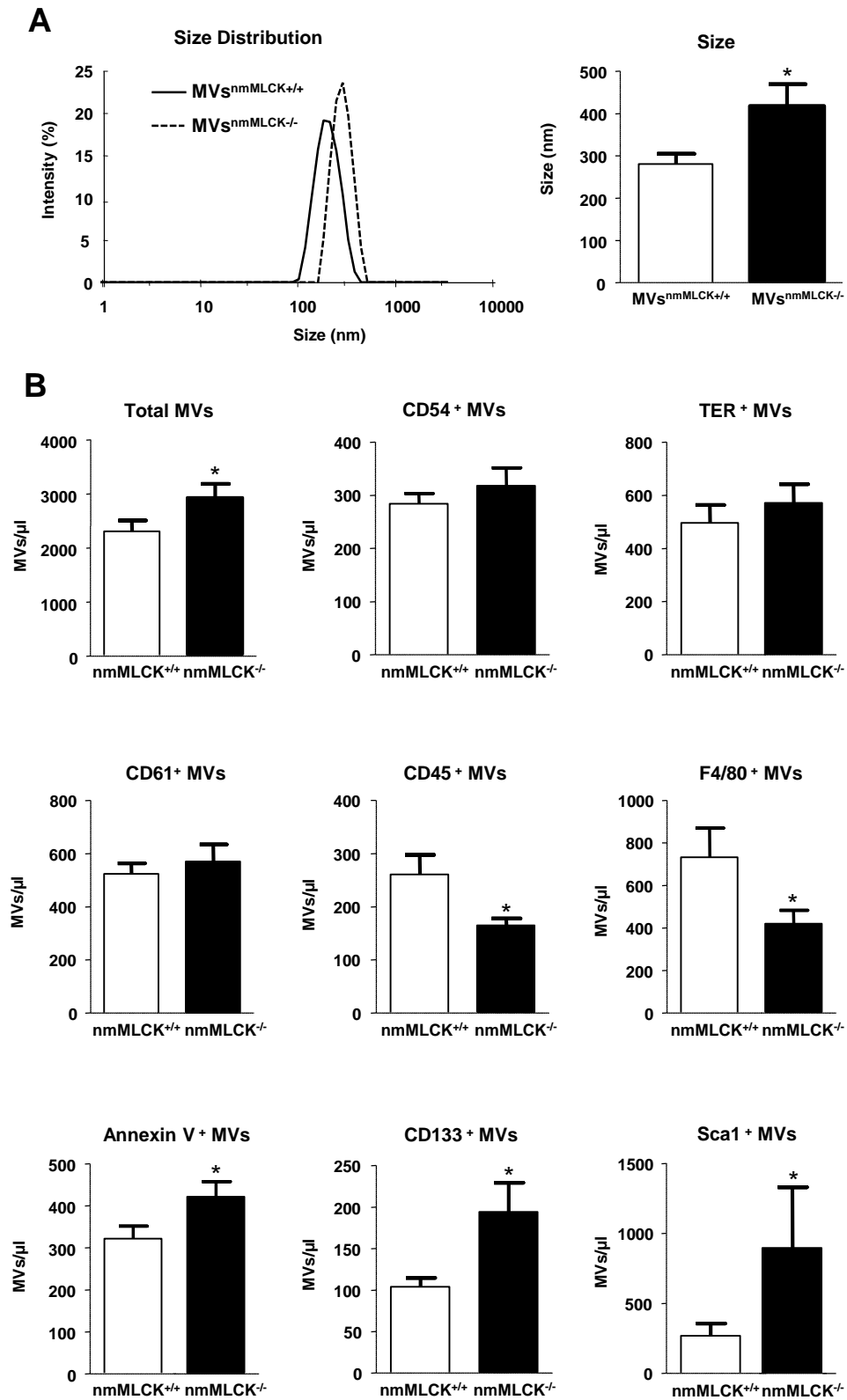
## RESULTS

### Deletion of nmMLCK increases the size of circulating MVs

Both MVs taken from wild type mice (MV<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup>) and MVs taken from nmMLCK deficient mice (MV<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>) had a size between 100-800 nm which corresponds to the interval used in the definition of MVs (Figure 1A). Furthermore, MV<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> displayed a significant increase (1.5-fold) of the average size compared to MV<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup>. Moreover, the analysis of the surface charge of MVs showed a decrease of the negative charge in MV<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> compared with MV<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> (Figure E1A). These results suggest that nmMLCK is involved in the physical characteristics associated with the formation of circulating MVs.

### Deletion of nmMLCK modifies levels and phenotypes of circulating MVs

Deletion of nmMLCK increased the number of total circulating MVs (Figure 1B). Phenotypical characterization of cellular origin of MVs showed that circulating levels of MVs from endothelial cells (CD54<sup>+</sup>), erythrocytes (TER<sup>+</sup>) and platelets (CD61<sup>+</sup>) were similar in both strains of mice. We observed a significant decrease of levels of leukocyte (CD45<sup>+</sup>) MVs (1.5-fold) and macrophage (F4/80<sup>+</sup>) MVs (1.7-fold) as well as a significant increase in procoagulant MVs (annexin V<sup>+</sup>) in nmMLCK<sup>-/-</sup> mice compared to nmMLCK<sup>+/+</sup> mice (Figure 1B). Also, MVs derived from progenitor cells (CD133<sup>+</sup>/Sca1<sup>+</sup>) were increased in nmMLCK<sup>-/-</sup> mice. These results show that nmMLCK deletion differentially affects the production of MVs depending on the type of cells.



**Figure 1: Deletion of nmMLCK increases size, and modifies phenotype of circulating MVs.** (A). Representative traces and mean of diameter in nm of the size distribution of MVs from nmMLCK<sup>+/+</sup> (line) and nmMLCK<sup>-/-</sup> mice (dots) evaluated with Malvern Zetasizer. Data represent the mean  $\pm$  SEM (n=8-15) \*p<0.05. (B). Circulating MVs collected from blood circulation were incubated with antibodies to discriminate

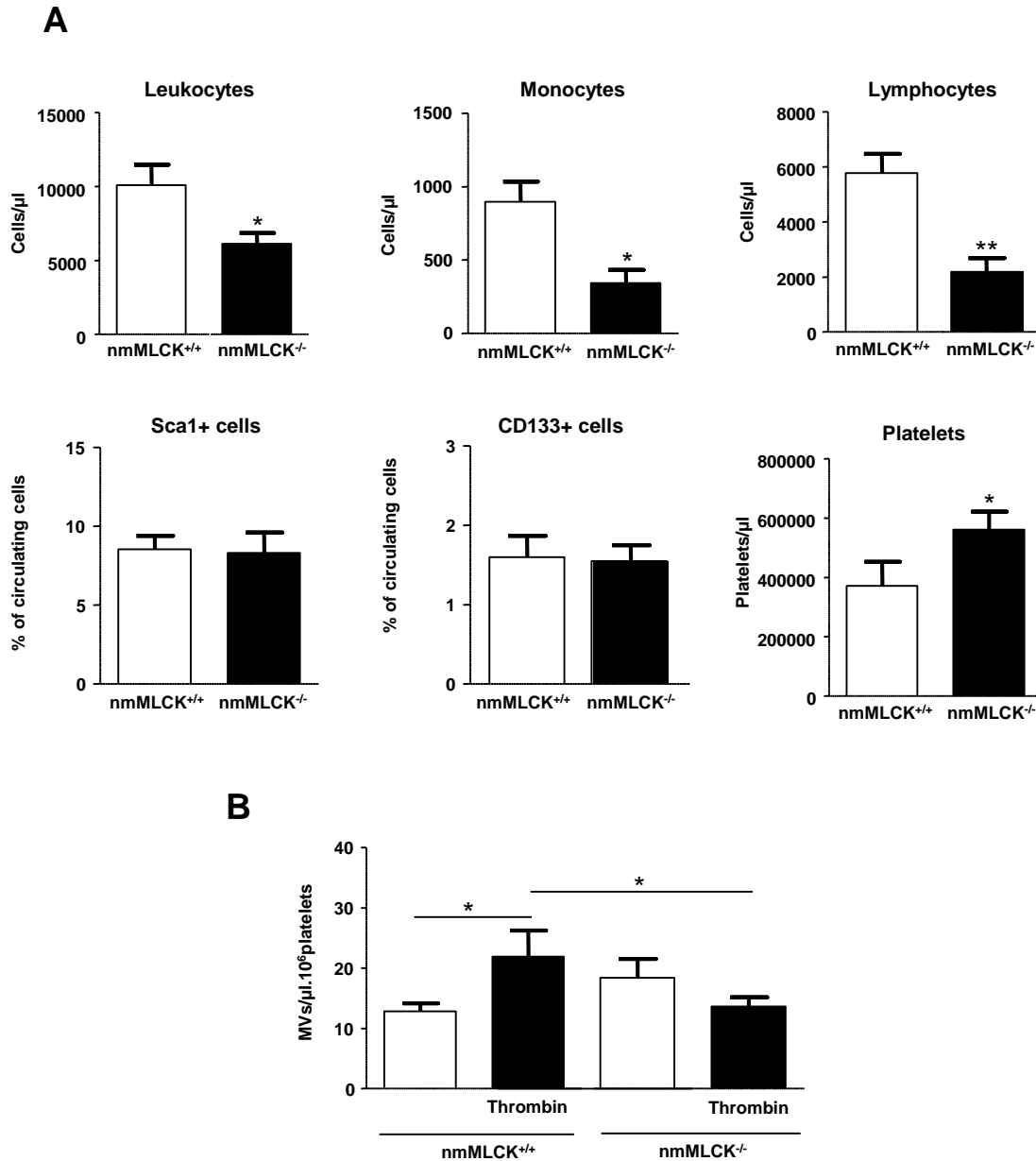
MV subpopulations according to the expression of membrane specific antigens by flow cytometer (see Materials and Methods for details). Histograms show total circulating MVs and endothelial cell- (CD54<sup>+</sup>), erythrocyte- (TER119<sup>+</sup>), platelet-(CD61<sup>+</sup>), leukocyte-(CD45<sup>+</sup>), macrophage-(F4/80<sup>+</sup>), procoagulant-(annexin V<sup>+</sup>), and progenitor-(CD133<sup>+</sup> and Sca1<sup>+</sup>) derived MVs from nmMLK<sup>+/+</sup> and nmMLK<sup>-/-</sup> mice. Values are expressed as events per  $\mu$ l and the data represent the mean  $\pm$ SEM (n=16-21) \*p<0.05.

### **Deletion of nmMLCK affects the number of circulating blood cells**

nmMLCK<sup>-/-</sup> mice displayed a significant decrease in the number of total leukocytes (~40%), especially, monocytes (~50%), and lymphocytes (~60%), which may explain the decreased number of their derived MVs (Figure 2A). The number of circulating progenitor cells (expressing either Sca1<sup>+</sup> or CD133<sup>+</sup>) remains unchanged. Surprisingly, although no change in the number of platelet-derived MVs was observed (Figure 1B), platelet count was significantly increased in nmMLCK<sup>-/-</sup> mice. These results suggest failed activation and/or budding of platelets in nmMLCK<sup>-/-</sup> mice.

### **Deletion of nmMLCK reduces budding of platelets in response to thrombin**

To confirm the hypothesis of decreasing ability of nmMLCK<sup>-/-</sup> mice platelets to release MVs, *in vitro* platelet-derived MVs released by thrombin activation were counted. In the absence of stimulation (Figure 2B), platelets from nmMLCK<sup>+/+</sup> or nmMLCK<sup>-/-</sup> mice released similar number of MVs; however, in response to thrombin, platelets from nmMLCK<sup>+/+</sup> mice displayed increased MV release, whereas platelets from nmMLCK<sup>-/-</sup> mice were insensitive to thrombin (Figure 2B). Changes in intracellular calcium concentration on platelets after thrombin stimulation was evaluated (Figure E1B). Deletion of nmMLCK did not affect basal cytosolic calcium on platelets neither increases of intracellular calcium concentration by thrombin. Altogether, nmMLCK deletion may affect downstream of calcium signalling in the budding of platelets in response to the thrombin.



**Figure 2: Deletion of nmMLCK affects the number of circulating blood cells and reduces budding of platelet in response to thrombin.** (A). Counting of circulating blood cells

(leukocytes, lymphocytes, monocytes, and platelets) was evaluated by an automated cell count analyzer (Beckmann Coulter). Progenitor cells were determined by incubating of peripheral blood mononuclear cells with anti-CD133 and Sca1 antibodies and analyzed in a flow cytometer. Data represent the mean  $\pm$  SEM (n=9-25) \*p<0.05, \*\*p<0.01. (B). Isolated platelets from nmMLCK<sup>+/+</sup> and nmMLCK<sup>-/-</sup> mice ( $2 \times 10^6$  platelets) were activated *in vitro* by thrombin at 0.1U/ml for 10 minutes at 37°C in presence of 0.05M of CaCl<sub>2</sub>. Platelet-derived

MVs were prepared by successive centrifugations and then counted by flow cytometry. Values are expressed as events per  $\mu\text{l}$  per  $10^6$  platelets and the data represent the mean  $\pm$ SEM (n=13) \*p<0.05.

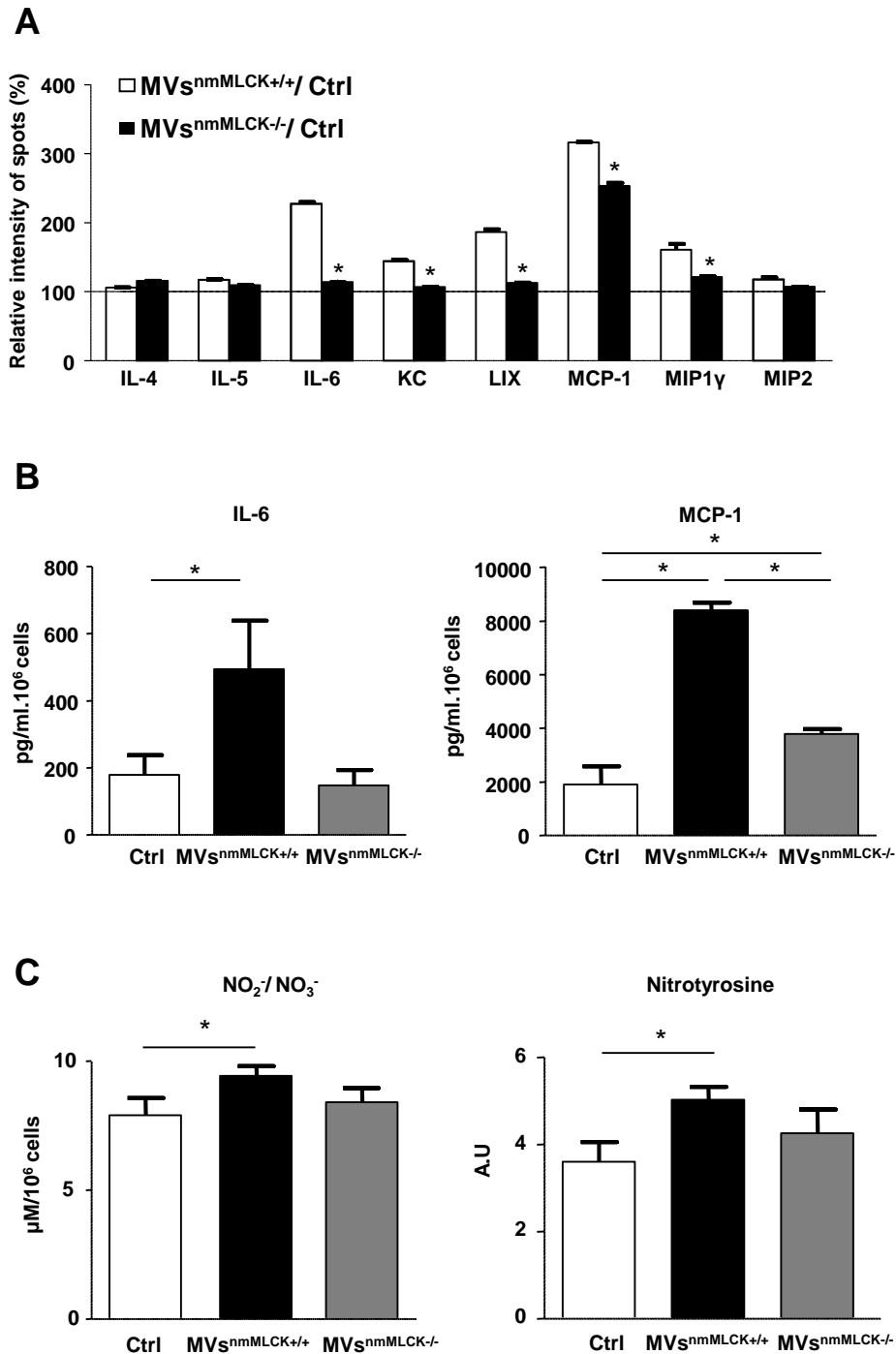
### **Deletion of nmMLCK modulates the effects of MVs on the secretome of mouse AoECs**

No significant differences on the cytokine content are observed between both types of MVs (Figure E2A and E2B). Next, we analysed by antibody array screening the effect of the deletion of nmMLCK on the effect of MVs to stimulate inflammatory cytokines on mouse AoECs (Figure E2C). Treatment with MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> induced a significant production of IL-6, small glycoprotein cytokine like (KC), LPS-induced CXC chemokine (LIX), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and macrophage inflammatory protein-1 gamma (MIP1- $\gamma$ ). In contrast, MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> only enhanced the production of MCP-1 (Figure 3A). Moreover, quantification of levels of secreted cytokines by ELISA corroborated that MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup>, but not MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>, significantly increased IL-6 production by mouse AoECs. It should be noted that MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> were able to induce the production of MCP-1 but this release was significantly lower than that produced by MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> treatment (Figure 3B). Thus, MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> are less active to induce the release of inflammatory cytokines from AoECs compared to MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup>.

### **Role of nmMLCK on the tyrosine nitration induced by MVs on AoECs**

Treatment with MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> was accompanied by significant increase in nitrative stress (nitrite/nitrate production and nitration of proteins) in the AoECs (Figure 3C and E3). No significant changes on nitrative stress were observed in AoECs after treatment by MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>. These results suggest that nmMLCK is involved in the effect of MVs to cause deleterious nitrative stress in AoECs.





**Figure 3: Deletion of nmMLCK modulates the effects of MVs on the secretome and protein nitration of mouse AoECs.** Primary endothelial cells isolated from mouse aorta (AoECs) of  $nmMLCK^{+/+}$  mice were treated for 24 hours with  $MVs^{nmMLCK+/+}$  or  $MVs^{nmMLCK-/-}$ . Cytokine production was evaluated by Ray Bio Mouse Cytokine Antibody Array 3 kit (see supplemental Figure E2A and E2C and Materials and Methods for more details). (A). Histograms show the cytokine ratio between either  $MVs^{nmMLCK+/+}$ -treated *versus* non-treated cells or  $MVs^{nmMLCK-/-}$ -treated *versus* non-treated cells. Black line represents no change in cytokine production between treatments. Results are expressed as a percentage of relative intensity of spots

(%). Data represent the mean of three experiments (n=3) \*p<0.05 *versus* MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup>/Ctrl. (B). Quantification of IL-6 and MCP1 secretion by ELISA assay. Data represent the mean of three experiments (n=3) \*p<0.05. (C). Quantification of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrite/nitrate) from the supernatant of AoECs previously treated by MVs, using Griess assay (left histogram). The protein nitration in AoECs was evaluated by Western blotting using antibody raised against nitrotyrosine-modified proteins and then, immunoblots were quantified by densitometric analysis (right histogram). Data are representative of three separate blots, and the densitometry values are expressed in arbitrary units (A.U) as mean ± SEM. \*p<0.05.

### **Internalization of MVs by AoECs**

In order to determine how MVs interact with endothelial cells, MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> and MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> were labeled with PKH67 to analyze their internalization in target cells (AoECs) (Figure E4A). After 24 hours of incubation, both types of MVs labeled with PKH67 were internalized by AoECs (Fig. E4B).

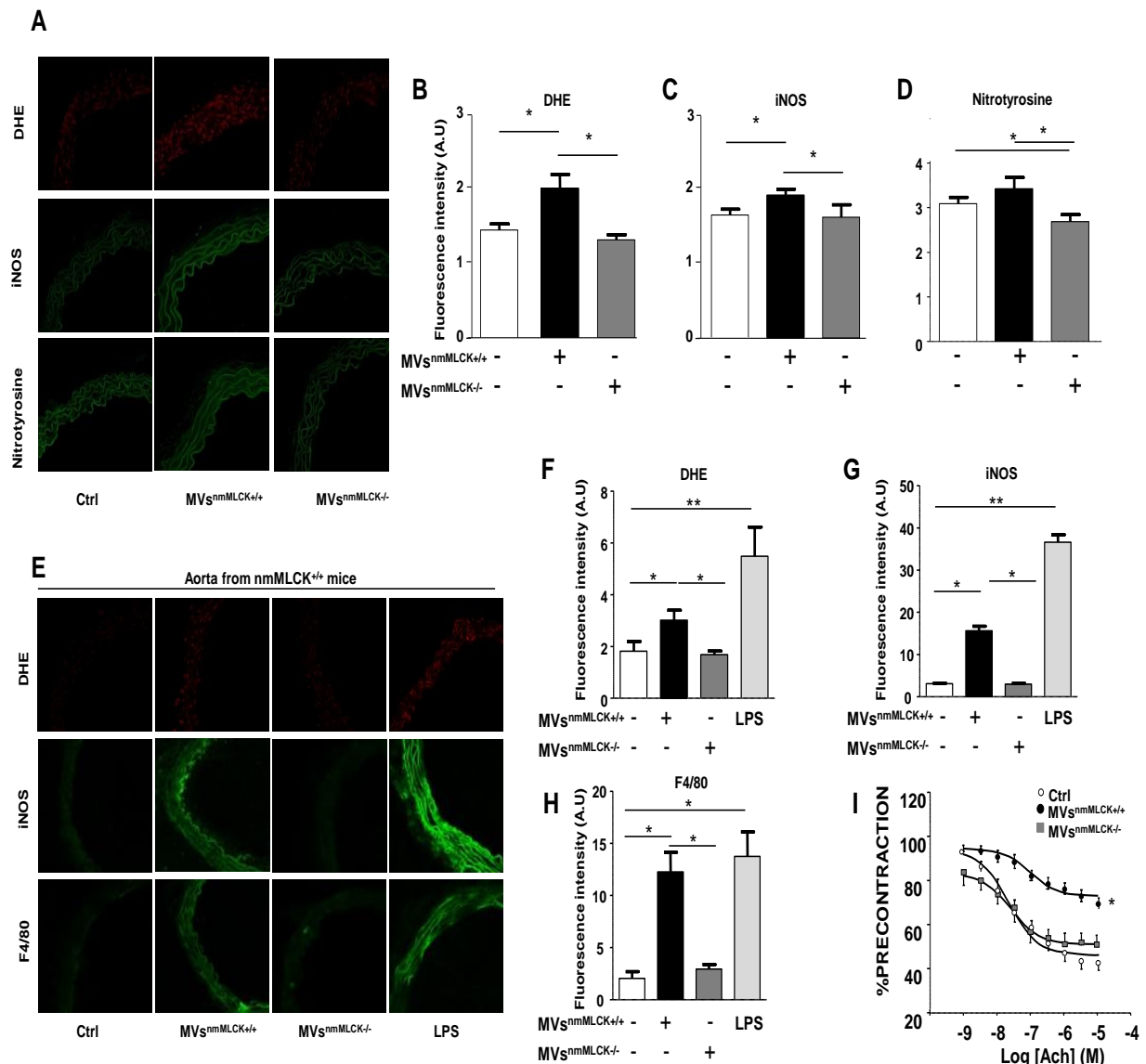
### **Role of nmMLCK on *ex vivo* pro-inflammatory effects of MVs**

Incubation of mouse aorta rings with MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> significantly increased dihydroethidine (DHE) labelling, indicating an increase on O<sub>2</sub><sup>-</sup> production, and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) without modifying nitrotyrosine levels compared with the non-treated aorta (Figure 4A-D). However, when aorta rings were treated with MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>, no significant changes in inflammatory markers (DHE, iNOS), and a decrease of nitrotyrosine were observed. Altogether, these results strongly suggest that deletion of nmMLCK reduces pro-inflammatory properties of MVs.

### **Role of nmMLCK on *in vivo* pro-inflammatory effects of MVs: pathophysiological relevance of MVs**

Similar to LPS treatment, injection of mice with MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> significantly increased DHE labelling, iNOS and F4/80 expressions (reflecting macrophage infiltration) in the aorta. However, MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>, as described above for *ex vivo* treatment, did not modify inflammatory markers (Figure 4E-H).

LPS treatment of nmMLCK<sup>-/-</sup> mice did not change in O<sub>2</sub><sup>-</sup> production compared to the nmMLCK<sup>+/+</sup> mice, whereas the deletion of nmMLCK partially protected against changes on MV levels, iNOS expression and macrophage infiltration (Figure E5). Thus, nmMLCK is involved in the induction of oxidative, nitrative stress and macrophage infiltration induced by MVs.



**Figure 4: nmMLCK deletion reduces pro-inflammatory effects and prevents endothelial dysfunction of MVs *ex vivo* (A-D) and *in vivo* (E-I).** (A). Confocal image staining of superoxide anion production by dihydroethidine (DHE) (red), nitric oxide synthase (iNOS) (green), and nitrotyrosine expression (green) in mouse wild type aorta exposed 24 hours *ex vivo* to saline salt solution (Ctrl),  $MVs^{nmMLCK+/+}$  or  $MVs^{nmMLCK-/-}$ . Aorta was imaged using confocal microscope. (B-D). Histograms show fluorescence intensity (A.U), of aorta DHE staining (B), iNOS (C) and nitrotyrosine (D), assessed by Image J. Background fluorescence intensity was subtracted using unstained aortas. Data represent the mean  $\pm$ SEM (n=3) \*p<0.05. (E). Confocal image staining of DHE (red), iNOS expression (green), and macrophage infiltration (F4/80 green) in aorta from wild type mice injected intravenously with saline salt solution (Ctrl),  $MVs^{nmMLCK+/+}$ ,  $MVs^{nmMLCK-/-}$  for 24 hours or intraperitoneally with LPS (40mg/Kg) for 4 hours. Aorta was imaged using confocal microscope. (F-H). Histograms show fluorescence intensity (A.U) of aorta DHE staining (F), iNOS (G) and F4/80 (H), assessed by Image J. Data expressed by fluorescence intensity (A.U) and represent the mean  $\pm$ SEM (n=3) \*p<0.05, \*\*p<0.01. (I). Endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (Ach) was evaluated by myography on aortic rings from  $nmMLCK^{+/+}$  mice, treated 24 hours intravenously with saline salt solution (Ctrl),  $MVs^{nmMLCK+/+}$  or  $MVs^{nmMLCK-/-}$  at their circulating concentration. The relaxation was expressed as a percentage of precontraction level. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA test. Data represent the mean of three experiments \* p<0.05.

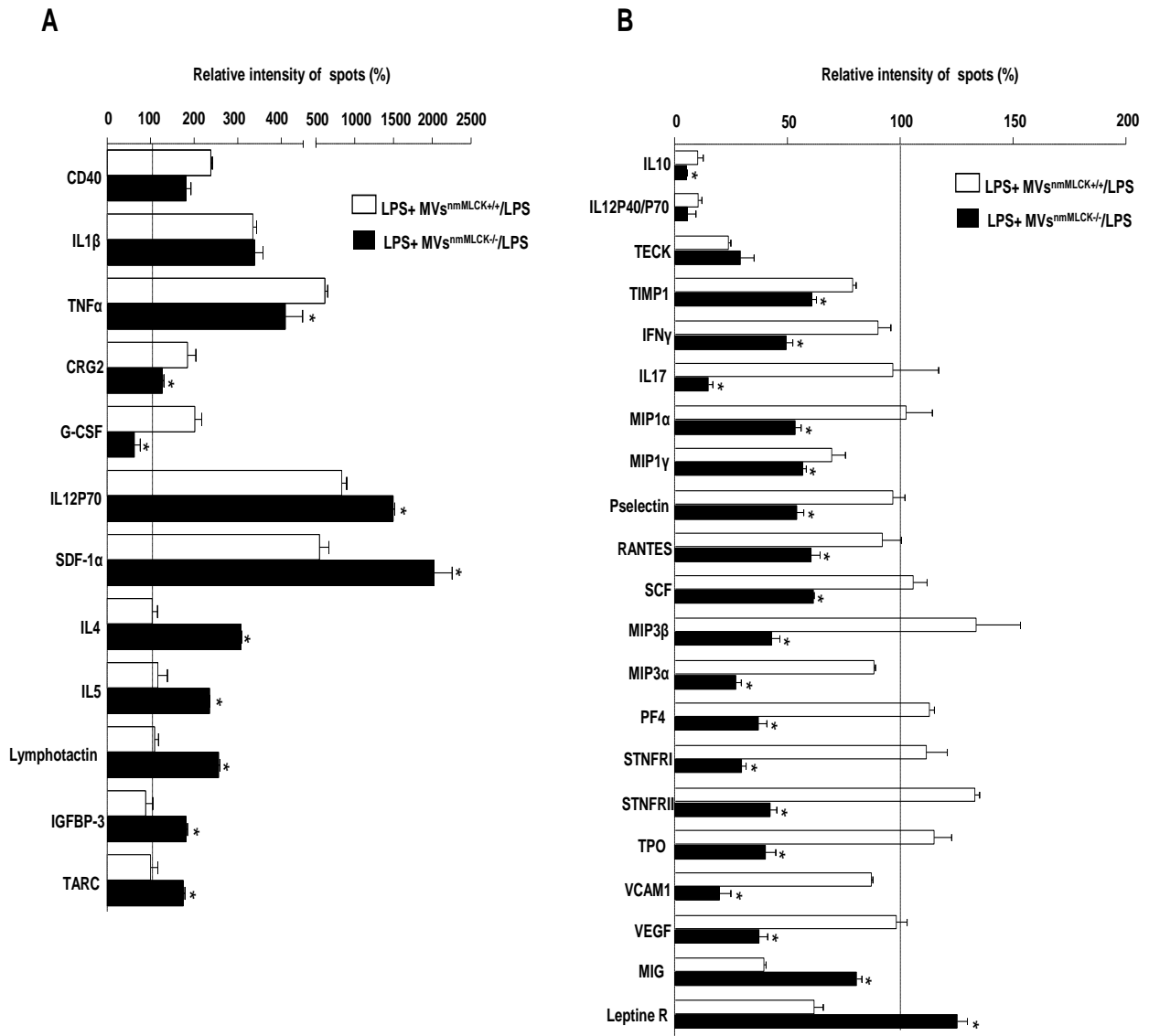
### **Endothelial dysfunction induced by MVs involves nmMLCK**

Aortic rings from  $nmMLCK^{+/+}$  mice relaxed in response to acetylcholine up to a maximum of relaxation at 10  $\mu$ M (60% of relaxation) (Figure 4I). Treatment with  $MVs^{nmMLCK+/+}$  induced significantly reduction of the maximal of relaxation (30% of relaxation) which traduces endothelial dysfunction. However,  $MVs^{nmMLCK-/-}$  did not affect the relaxation induced by acetylcholine. Thus, nmMLCK is involved in the endothelial dysfunction triggered by MVs.

### **$MVs^{nmMLCK-/-}$ protect against the effects of LPS by increasing anti-inflammatory and reducing pro-inflammatory secretome in AoECs**

LPS treatment significantly increased the production by AoECs of several inflammatory cytokines and chemokines analysed by array (Figure E6). In the presence of LPS,  $MVs^{nmMLCK+/+}$  increased the production of pro-inflammatory cytokines such as CD40, IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), stromal cell-derived factor 1 alpha (SDF-1 $\alpha$ ) and IL-12P70 active form of IL-12 cytokine (observed also by decreased ratio IL12P40/P70, IL12P40 antagonist form of IL12P70) (Figure 5A). Furthermore,  $MVs^{nmMLCK+/+}$  reduced anti-

inflammatory cytokine (IL-10), and pro-inflammatory chemokines (TECK, MIG) (Figure 5B). In contrast, MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> induced a lower increase of TNF $\alpha$ , CRG2 and G-CSF than MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> treatment, and a higher enhancement of IL-12P70 and SDF-1 $\alpha$  (Figure 5A). Interestingly, MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> enhanced the release of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-5), insulin like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) and lymphocyte chemokines (lymphotactin and thyroid activation regulated chemokine TARC). Moreover, MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> decreased several pro-inflammatory cytokines (TIMP1, IFN $\gamma$ , IL-17, MIP family, P-selectin, Rantes, VCAM1) (Figure 5B). These results show that the protective effect of MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> against the deleterious effects of LPS was due to their ability both to increase anti-inflammatory and to reduce pro-inflammatory secretome in AoECs.



**Figure 5: MVs<sup>nmMLCK-/-</sup> protect against the effects of LPS by increasing anti-inflammatory and reducing pro-inflammatory secretome in AoECs.** AoECs were treated for 24 hours with LPS alone (10 $\mu$ g/ml), LPS+MVsnmMLCK+/+ or LPS+MVsnmMLCK-/. Cytokine production was evaluated by Ray Bio Mouse Cytokine Antibody Array 3 kit (see supplemental Figure E6 and Materials and Methods for more details). (A and B). Histograms show the cytokine ratio between either LPS+MVsnmMLCK+/+ -treated *versus* LPS-treated cells or LPS+MVsnmMLCK-/- -treated *versus* LPS-treated cells. Black line represents no change in cytokine production between treatments. Results are expressed as a percentage of relative intensity of spots (%). Data represent the mean of three experiment (n=3) \* p<0.05.

### **MVs<sup>nmMLCK-/-</sup> reduce the deleterious nitrative stress induced by LPS in AoECs**

LPS treatment increased significantly nitrative stress (nitrite/nitrate and nitration of proteins) in AoECs (Figure 6A and 6B). In the presence of LPS, MVs<sup>nmMLCK+/+</sup> did not modify neither production of nitrite/nitrate nor nitration of proteins when compared to the LPS alone. In contrast, MVs<sup>nmMLCK-/-</sup> significantly reduced the deleterious effect of LPS (Figure 6A and 6B). Thus, MVs<sup>nmMLCK-/-</sup> protect against the deleterious nitrative stress induced by LPS in AoECs.

### **MVs<sup>nmMLCK-/-</sup> prevent the inflammatory effect of LPS *ex vivo* and *in vivo***

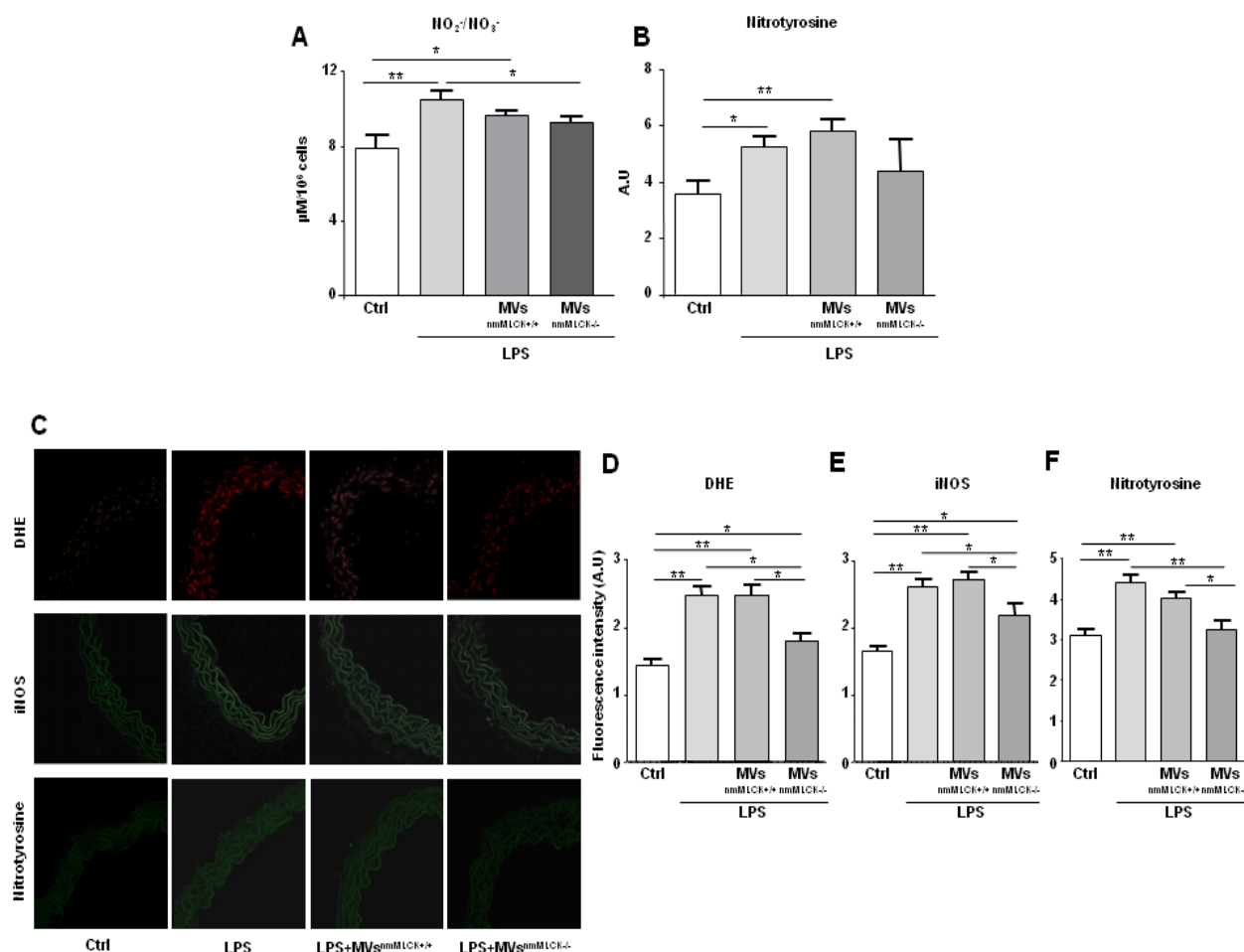
As expected, LPS incubation significantly increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> production, iNOS expression and nitration of tyrosine. In the presence of LPS, MVs<sup>nmMLCK+/+</sup> did not modify the DHE labelling, iNOS expression and nitrotyrosine levels when compared to the LPS alone (Figure 6C-F). Interestingly, MVs<sup>nmMLCK-/-</sup> prevented the effect of LPS to induce O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and tyrosine nitration and significantly reduced iNOS overexpression in the aorta (Figure 6C-F).

In order to evaluate the contribution of MVs into the protective effect of nmMLCK deletion, we have intravenously injected wild type mice with LPS (10 µg/ml), LPS+MVs<sup>nmMLCK+/+</sup> or LPS+MVs<sup>nmMLCK-/-</sup>. As expected, treatment with LPS induced significant reduction of the maximal of relaxation (~80% of inhibition) compared to vessels taken from NaCl-injected animals, which traduces endothelial dysfunction (Figure 7). Also, LPS+MVs<sup>nmMLCK+/+</sup> injection decreased endothelial relaxation to similar extent than LPS alone. Interestingly, MVs<sup>nmMLCK-/-</sup> partially correct the effect of LPS on the endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine. Thus, MVs<sup>nmMLCK-/-</sup> contribute, at least partially, to the protective effect of nmMLCK deletion, regarding endothelial dysfunction.

Together, these results suggest that deletion of nmMLCK leads to protective effects of MVs to correct LPS inflammation.

## All subtypes of MVs are needed to induce vascular protection

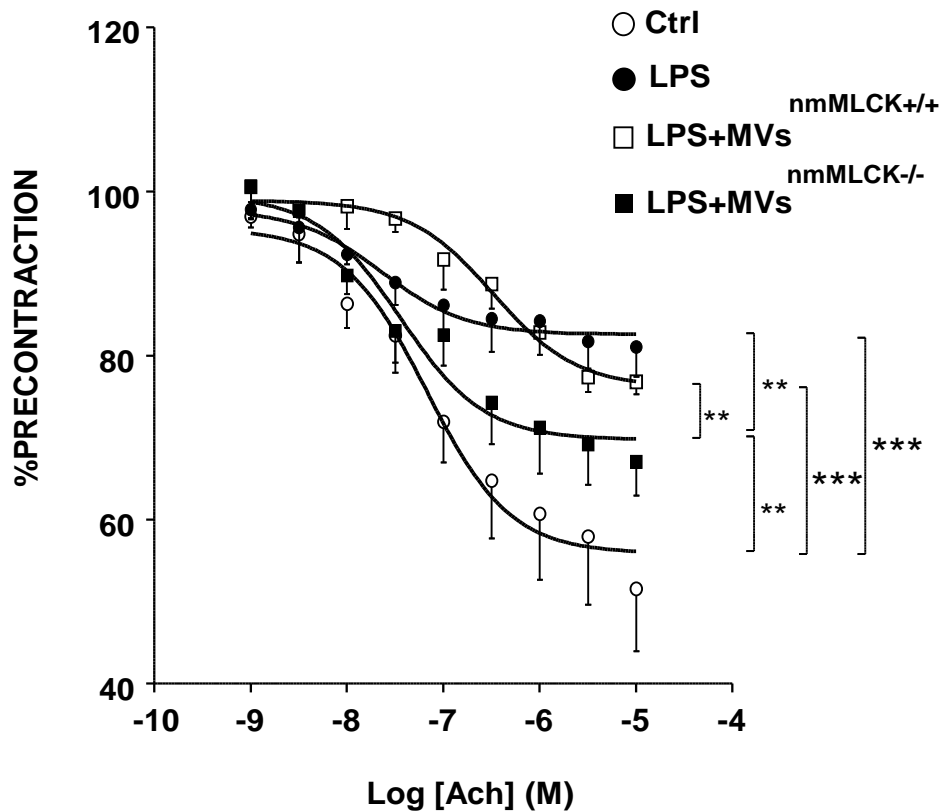
As shown in Figure E7, neither platelet (CD61+)- nor non-platelet (CD61-)-derived MVs modified the increased  $O_2^-$  production and iNOS expression induced by LPS treatment in aorta, suggesting that all subtypes of MVs are required for the protective effects of  $MVs^{nmMLCK-/-}$ .



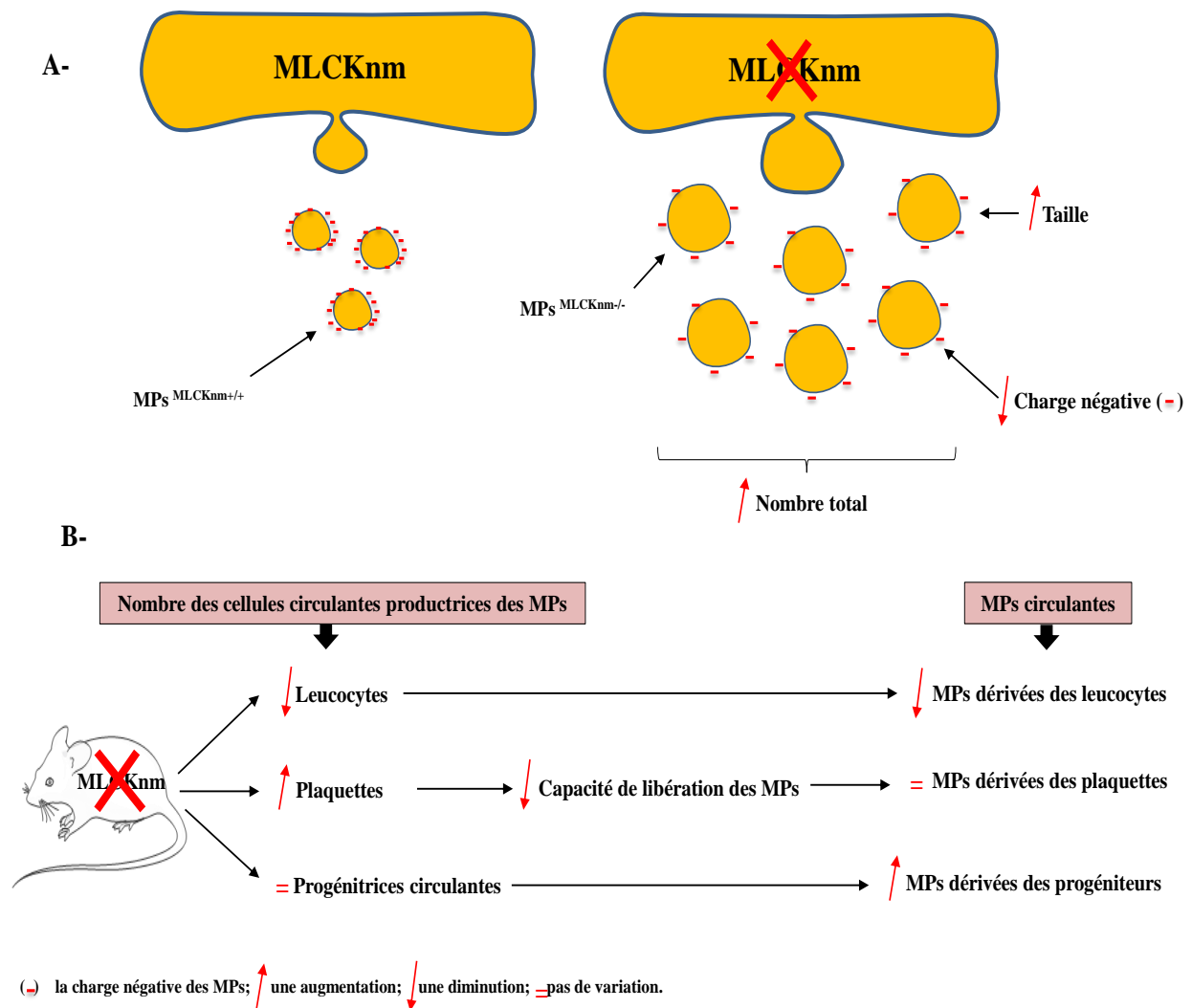
**Figure 6:  $MVs^{nmMLCK-/-}$  reduce the LPS-evoked nitritative stress in AoECs and *ex vivo* inflammation induced by LPS in mouse aorta.** AoECs were treated for 24 hours with LPS alone (10 $\mu$ g/ml), LPS+ $MVs^{nmMLCK^{+/+}}$  or LPS+ $MVs^{nmMLCK^{-/-}}$ . (A). Quantification of  $NO_2^-/NO_3^-$  (nitrite/nitrate) from the supernatant of treated AoECs evaluated by Griess assay. Data represent the mean  $\pm$ SEM (n=3) \*p<0.05, \*\*p<0.01. (B). The protein nitration in AoECs was evaluated by Western blot using antibody raised against nitrotyrosine-modified proteins and then, immunoblots were quantified by densitometric analysis. Data are representative of three separate blots, and the densitometry values are expressed in arbitrary units (A.U) as mean



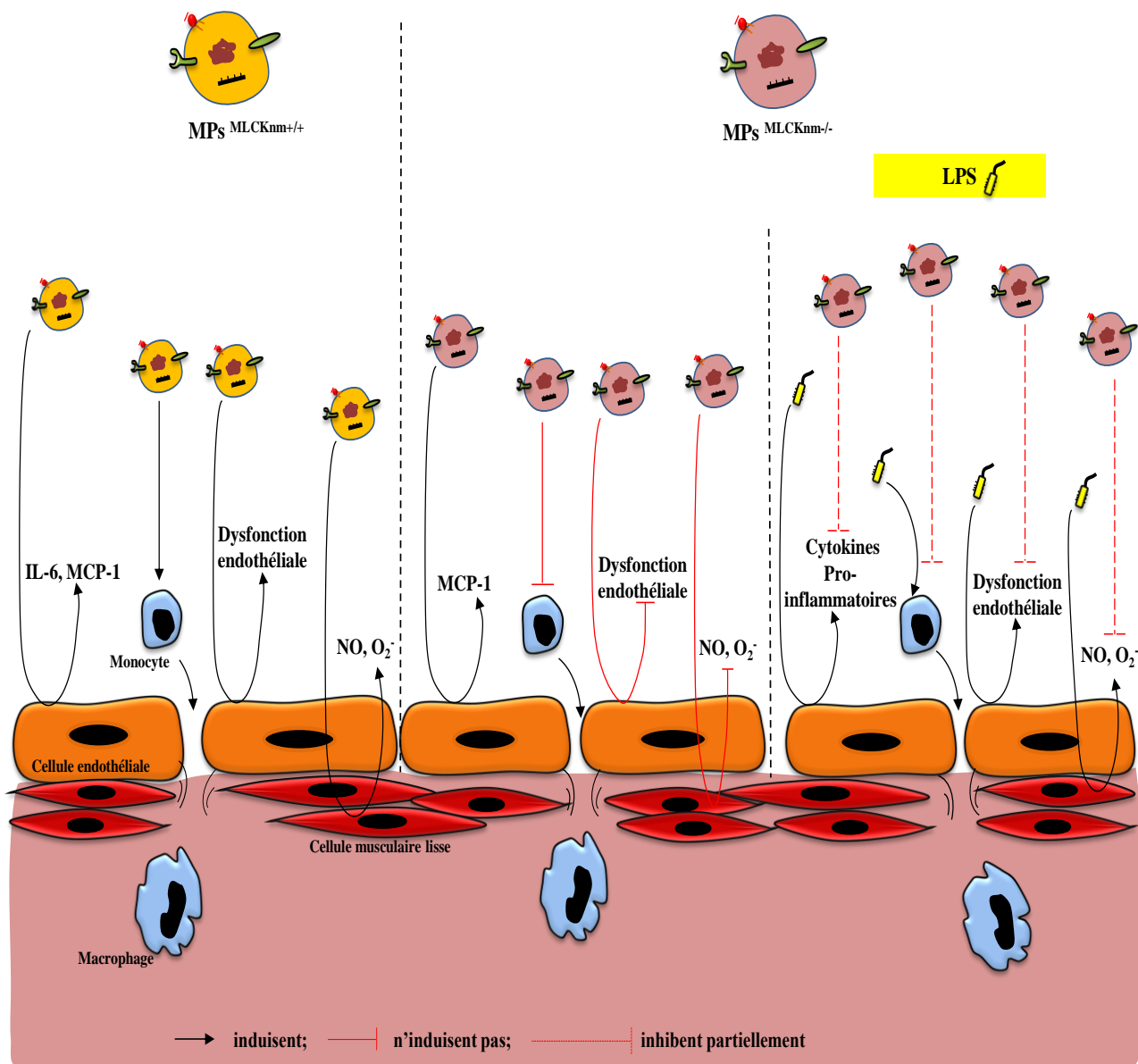
$\pm$  SEM \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01. (C). Confocal image staining of DHE (red), iNOS (green), and nitrotyrosine expression (green) in mouse wild type aorta exposed 24 hours *ex vivo* to saline salt solution (Ctrl), LPS alone (10 $\mu$ g/ml), LPS+MV<sub>s</sub><sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> or LPS+MV<sub>s</sub><sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>. Aorta was imaged using confocal microscope. (D-F). Histograms show fluorescence intensity (A.U) of aorta DHE staining (D), iNOS (E), and nitrotyrosine (F), assessed by Image J. Data represent the mean  $\pm$ SEM (n=3) \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.



**Figure 7: MV<sub>s</sub><sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> partially prevent the endothelium dysfunction induced by LPS *in vivo*.** nmMLCK<sup>+/+</sup> mice were injected intravenously with saline salt solution (Ctrl), MV<sub>s</sub><sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> or MV<sub>s</sub><sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>. After 20 hours, mice were injected intraperitoneally with LPS (40 mg/Kg) for 4 hours. nmMLCK<sup>+/+</sup> mice injected only with LPS (40mg/Kg) for 4 hours as used as positive control. Endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (ACh) was evaluated by myography. The relaxation was expressed as a percentage of precontraction level. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA test. Data represent the mean of three experiments \* $p$ <0.05.



**Figure 15: Schéma récapitulatif des principaux résultats de la première partie de l'étude. (A)** Conséquences de la délétion de MLCKnm sur les propriétés physiques des MPs circulantes. La délétion de MLCKnm augmente le nombre total et la taille moyenne des MPs; cependant, elle diminue la charge négative portée par les MPs. **(B)** Conséquences de la délétion de MLCKnm sur les cellules circulantes productrices des MPs. les souris KO MLCKnm présentent une diminution du nombre des leucocytes circulantes ainsi que les MPs dérivées des leucocytes, et une augmentation des MPs dérivées des cellules progénitrices. Les plaquettes issues des souris déficientes en MLCKnm présentent une réduction au niveau de la capacité à libérer des MPs. Ce défaut est compensé par une augmentation du nombre des plaquettes chez les souris KO MLCKnm.



**Figure 16: Schéma récapitulatif des principaux résultats de la deuxième partie de l'étude.**  $MPs^{MLCK^{nm+/+}}$  : MPs circulantes issues des souris sauvages;  $MPs^{MLCK^{nm-/-}}$  : MPs circulantes issues des souris KO  $MLCK^{nm}$ . IL-6: interleukine 6; MCP-1: protéine chimiokine des monocytes 1; NO: monoxyde d'azote;  $O_2^-$ : anion superoxyde. Les  $MPs^{MLCK^{nm+/+}}$  induisent la production par les cellules endothéliales du IL-6 et MCP-1. Les  $MPs^{MLCK^{nm-/-}}$  induisent la production que du MCP-1. Les  $MPs^{MLCK^{nm+/+}}$  et non pas les  $MPs^{MLCK^{nm-/-}}$ , induisent l'infiltration des macrophages, une dysfonction endothéliale ainsi qu'une production de NO et  $O_2^-$ . En présence du LPS, les  $MPs^{MLCK^{nm-/-}}$  protègent partiellement contre les effets du LPS.

## Discussion

In the present study, we show that nmMLCK deletion affected the size and the number of circulating MVs. Although platelet count was increased in nmMLCK<sup>-/-</sup> mice, the ability of platelets to release MVs in response to thrombin was reduced. Also, nmMLCK<sup>-/-</sup> mice displayed decreased number of leukocyte-derived MVs that was associated with reduced leukocyte count. In addition, although the number of circulating progenitor cells was not different between both types of mice, MVs released from progenitor cells were enhanced in nmMLCK<sup>-/-</sup> mice suggesting an activation of progenitor cells. Although both types of MVs were internalized by AoECs, MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup>, but not MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>, increased pro-inflammatory cytokine secretion by AoECs, induced oxidative and nitrative stresses, and macrophage infiltration as well as endothelium dysfunction in aorta. In the presence of LPS, MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> induced *in vitro* anti-inflammatory cytokine release and prevented the deleterious effects of LPS in aorta both *ex vivo* and *in vivo*. Finally, the presence of all cellular origins of MVs are needed to obtain the protective effect of MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>. Altogether, these findings provide evidence that nmMLCK plays role in the cellular activation, and release of circulating MVs, as well as the number of circulating cells. Furthermore, these findings support the hypothesis that nmMLCK deletion generates circulating MVs displaying protective effect by activating pro-resolving anti-inflammatory pathways.

The present study shows the implication of nmMLCK on the process of MV formation. Activation of nmMLCK by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin or by tyrosine kinase-mediated phosphorylation at Tyr-464 and Tyr-471 phosphorylated regulatory MLC-2 at Ser-19 and subsequently at Thr-18, resulting in a change in the myosin tertiary structure favoring contractile movement against actin. In addition, nmMLCK may be simultaneously involved in the control of cytoskeleton architecture and actomyosin activation (12). It has been shown that nmMLCK physically interacted with cortactin in endothelial cells and modulated cytoskeletal

organization and rearrangement (13). It is well known that cytoskeleton disorganization represents an essential step in the process of MV generation, and at this level, nmMLCK may interact with other cytoskeleton proteins and contribute to the MV formation. This may explain the present results which demonstrate that the deletion of nmMLCK increased the size and the number of total circulating MVs. The increase in the number of circulating MVs is probably not due to their decreased clearance on nmMLCK<sup>-/-</sup> mice because alterations on production of platelet-derived MVs from nmMLCK<sup>-/-</sup> mice were also observed *in vitro*. Indeed, in this study, we have also demonstrated that nmMLCK plays a role in the budding of platelets in response to thrombin without affecting intracellular calcium concentration. Recently, it has been shown that the phosphorylation of MLC-2a by MLCK in response to the oxidized low density lipoproteins contributes to the shape modification and platelet activation (14). Furthermore, Itoh et al (15) concluded that mono- and diphosphorylation of myosin by MLCK play a role in the initial phase of *in vivo* activation of thrombin-stimulated platelets. We show that nmMLCK<sup>-/-</sup> mice displayed decreased number of circulating leukocytes which was associated with the reduction of leukocyte-derived MVs. It is unlikely that the decrease of leukocyte number was due to a decreasing passage of mature circulating cells from the bone marrow toward the bloodstream because of the number of circulating progenitor cells derived from bone marrow was not affected in nmMLCK<sup>-/-</sup> mice. However, it is possible that leukocyte progenitor cells were decreased in the bone marrow from nmMLCK<sup>-/-</sup> mice, but this hypothesis remains to be studied. Accordingly, it has been shown that actomyosin interaction in bone marrow stem cells modulated hematopoiesis and lineage specification and/or function (16). Since activation of MLCK is a key step in the development of actomyosin-based contractile forces (17), it is plausible that nmMLCK may participate in the regulation of differentiation of progenitor cells from bone marrow.

We show that circulating MVs from wild type mice display pro-inflammatory properties *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* by producing pro-inflammatory cytokines, and endothelial dysfunction by increasing both oxidative and nitrative stress. This suggests that blood vessels of wild type mice being continuously exposed to MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> may release other circulating factors in order to compensate the deleterious effects of wild type MVs. In contrast, circulating MVs isolated from nmMLCK<sup>-/-</sup> mice were unable to stimulate endothelial cells to produce pro-inflammatory cytokines, endothelial dysfunction and oxidative, nitrative stress. These results are in agreement with those previously published. Indeed, it is clearly demonstrated that nmMLCK deficient mice were protected against endotoxic shock in two models of sepsis (LPS and cecal ligation and puncture models) in terms of mortality (3). Indeed, nmMLCK may intervene upstream at the early phase of LPS-induced NF-κB activation and cytokine release. In conjunction with these results, Eutamene et al (18) reported that the inhibition of nmMLCK inhibited the neutrophilic inflammation caused by LPS.

It has been shown that human monocytes treated by LPS were able to release MVs carrying bioactive IL-1β and transcripts for pro-inflammatory cytokines such as TNF, IL-6 and IL-8 (19, 20).—Also, MVs released by human endothelial cells and monocytes after TNF-α stimulation up-regulated podocyte production of pro-inflammatory MCP-1 and IL-6 (21). Interestingly, under pro-inflammatory conditions such as LPS infusion, injection on systemic circulation of MVs generated *in vitro* from human endothelial cells increased levels of IL-1β and TNF-α, suggesting that MVs prime injury-associated inflammation in mice (22). In contrast, other types of MVs possessed anti-inflammatory and beneficial effects. Activated human neutrophils released MVs were able to reduce inflammatory response mediated by macrophages exposed to LPS by mechanism related to annexin A1 (23, 24). Similarly, MVs enriched in alpha-2-macroglobulin preserved neutrophil chemotactic responses in the presence of LPS and consequently activated pro-resolving pathways (25). Also, we previously

reported that MVs from activated/apoptotic T cells carried the morphogen sonic hedgehog, essential for promoting *in vitro* angiogenesis of human endothelial cells and *in vivo* neovascularization after hind limb ischemia in mice (26, 27). Thereby, in the present work, we show that engineered MVs by deletion of nmMLCK, carrying similar cytokines than those from wild type mice, enhance pro-resolving responses in both endothelial cells and blood vessels, and then could well represent new and promising therapeutic strategies.

Next, we evaluated whether under pathophysiological conditions, that is, in the presence of LPS, MVs from nmMLCK<sup>-/-</sup> mice retain their protective effects. Interestingly, we demonstrate that MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> partially corrected inflammatory responses elicited by LPS in *in vitro* cultured endothelial cells and at the vascular wall. Indeed, MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> stimulated endothelial cells to produce anti-inflammatory cytokines and reduced pro-inflammatory cytokines and reduced iNOS expression, superoxide anion production and macrophage infiltration into the vascular wall. In addition, the presence of all cellular origins of MVs are necessary for the protective effect of MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> since separation of CD61<sup>+</sup> and CD61<sup>-</sup> subsets of MVs lead to the disappearance of protective effects. Although the mechanism(s) is(are) not completely elucidated, we can hypothesize that MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> might carry transcription factors or miRNA presenting anti-inflammatory functions which contribute to reduce inflammatory effect of LPS on target cells. Further studies are needed to fully characterize the composition of MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>.

In summary, this study provides evidence that nmMLCK plays an important role in the cell activation, process of budding and release of circulating MVs, as well as the number of circulating cells. This explains the variations in the rate, phenotype, and the physical properties of MVs. Deletion of nmMLCK generates circulating MVs with a protective potential. They underscore that nmMLCK may represent a candidate in the regulation of pro-resolving responses in sepsis by engineered MVs.

## **Acknowledgments**

We thank the laboratory Inserm U1066 (Pr. P. Saulnier, Angers) and C. Guillet (PACEM platform) for their help to carry out the measurement of the size and charge of the MVs and sorting of MVs, respectively. We thank L. Vergori for helping to isolate progenitor cells, M. Wertheimer and the staff of SCAHU for the care of animals. nmMLCK knock-out mice were provided by D.M. Watterson, Center for Drug Discovery and Chemical Biology, Northwestern University, Chicago, IL. This work is partially supported by the Région Pays de la Loire (CIMATH-2 project), Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-BSV1-0024-01), INSERM and Université d'Angers.

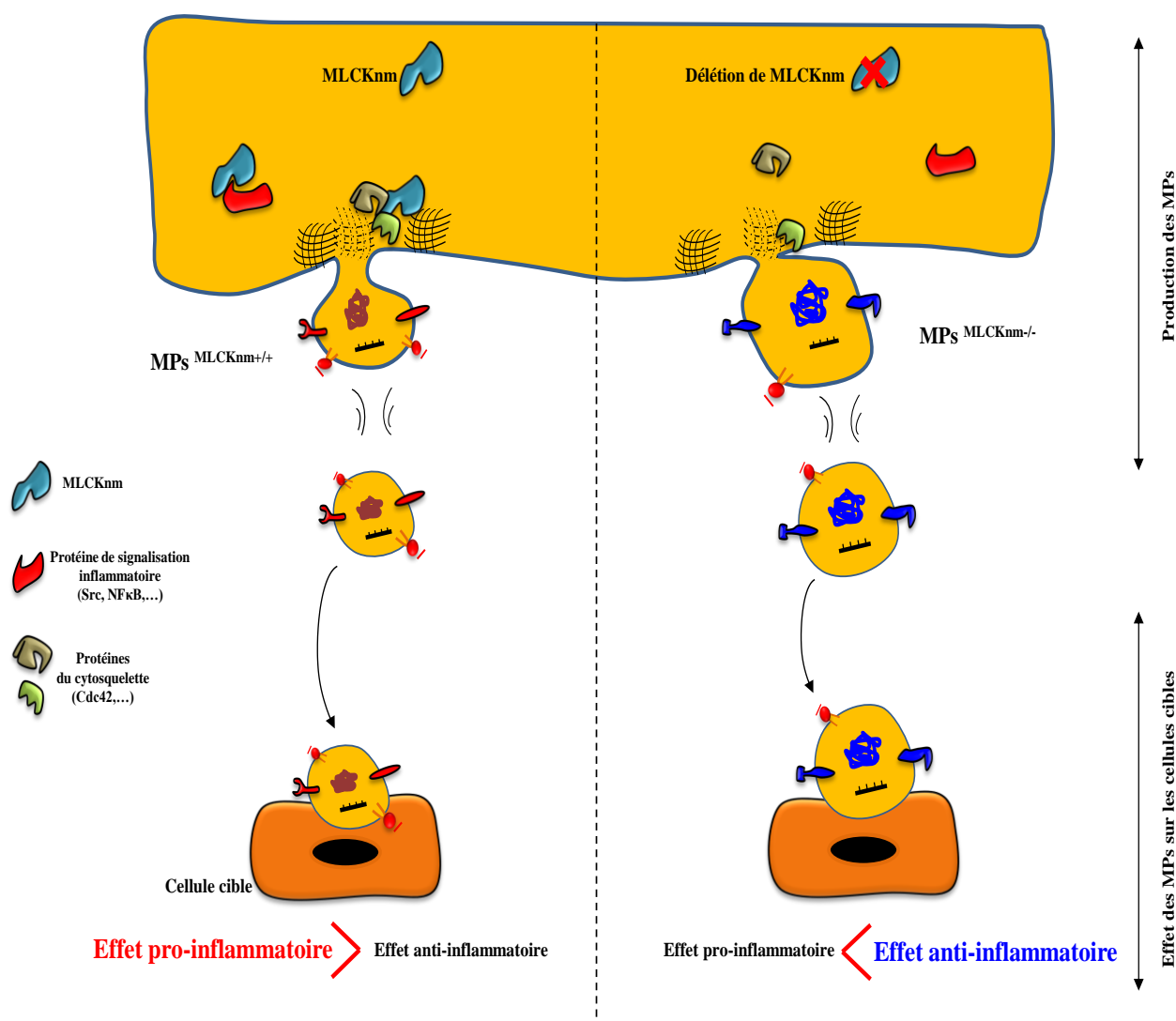
## **Authorship Contributions**

Acquisition of data: AG; Analysis and interpretation of data: AG, CM, RA; Drafting of the manuscript: AG, CM, RA; Study concept and design: CM, RA.

## **Conflict of Interest Disclosures**

The authors declare that they have no conflict of interest.





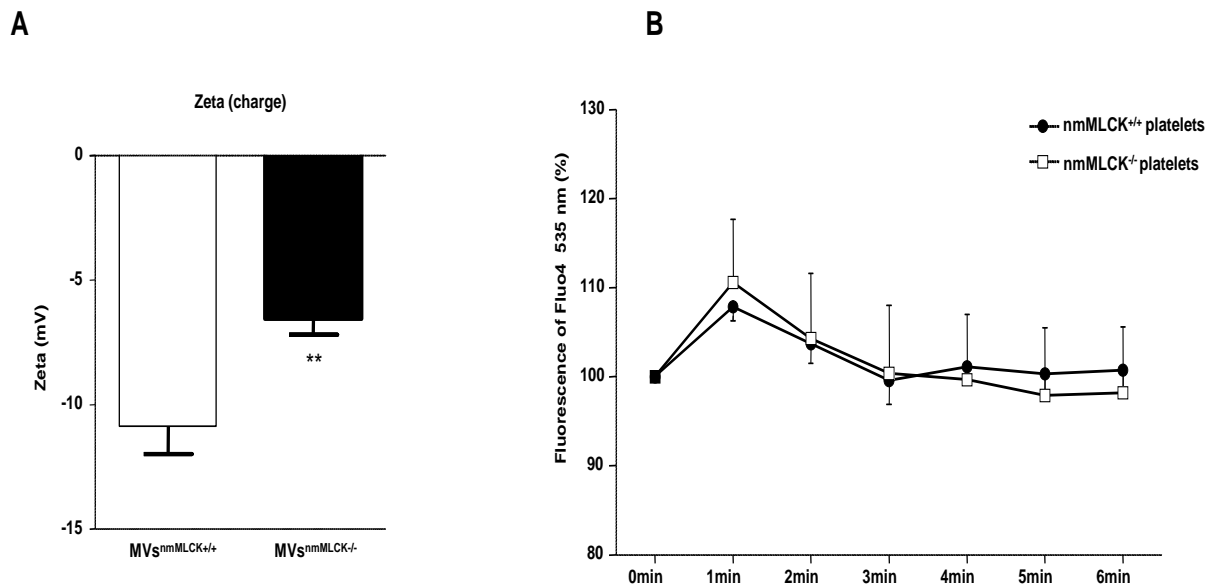
**Figure 17: Schéma récapitulatif de l'étude.** La délétion de MLCKnm affecte le mécanisme de production et de libération des MPs circulantes, ainsi que leurs effets sur les cellules cibles. Les MPs issues des souris KO MLCKnm possèdent de propriétés anti-inflammatoires. MPs<sup>MLCKnm+/+</sup> : MPs issues des cellules exprimant MLCKnm; MPs<sup>MLCKnm-/-</sup> : MPs issues des cellules KO MLCKnm.

## **EXPANDED VIEW MATERIAL**

### **Non-muscle myosin light chain kinase is critical for microvesicle-induced inflammation by endotoxin**

Abderahim Gaceb, M. Carmen Martinez, Ramaroson Andriantsitohaina

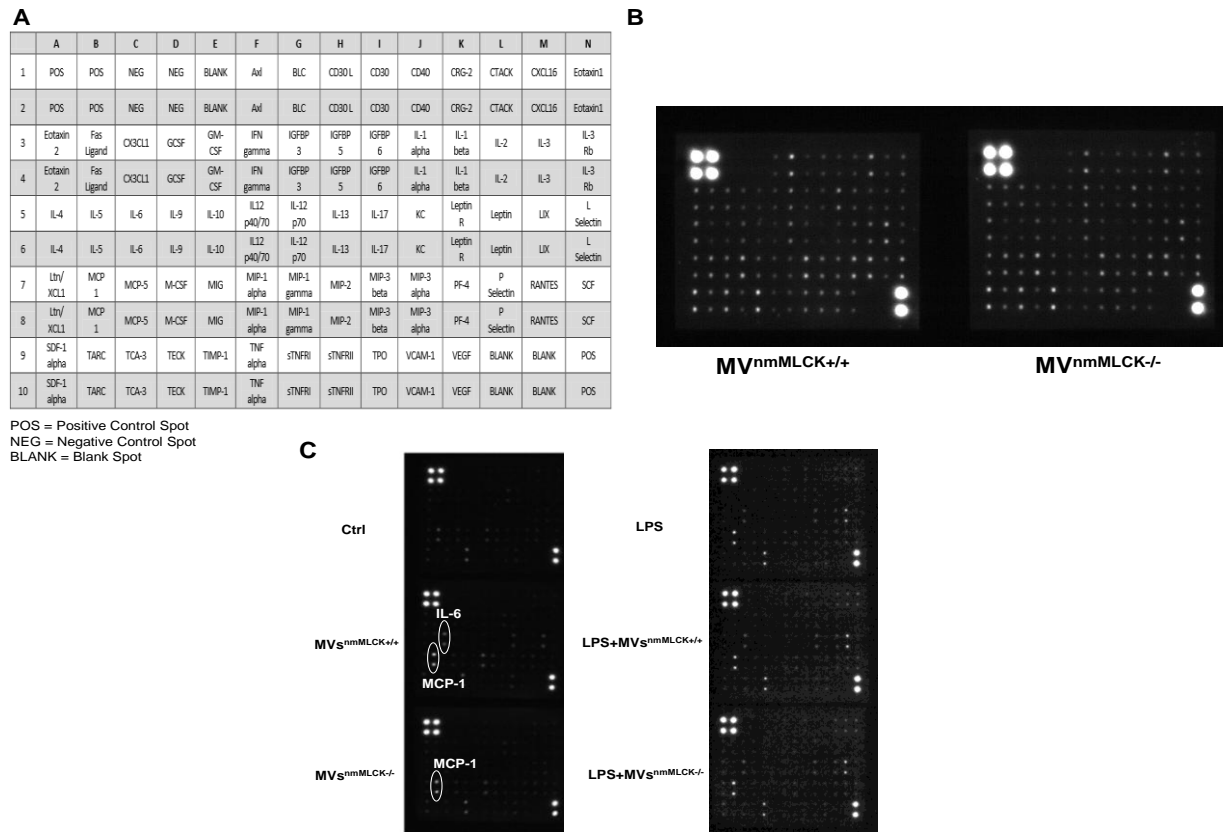
## Expanded view: FIGURES



**Figure E1: Deletion of nmMLCK affects the charge of circulating MVs but not the evolution of intracellular calcium concentration on platelets after thrombin stimulation.**

(A). Charge of circulating MVs expressed by milliVolts (mV) evaluated by Malvern Zetasizer (see supplemental Methods for details). Data represent the mean  $\pm$  SEM (n=8-15) \*\*p<0.01.

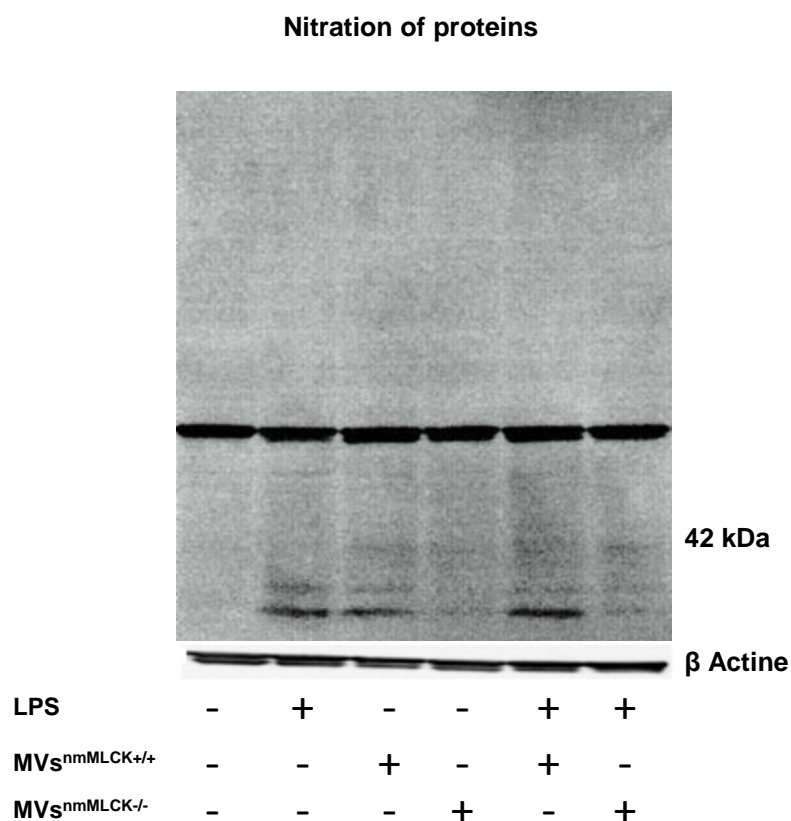
(B). Isolated platelet from nmMLCK<sup>+/+</sup> and nmMLCK<sup>-/-</sup> mice ( $2 \times 10^6$  platelets) were incubated with calcium probe Fluo4 (3 $\mu$ M) for 45 min at 37°C and then, activated by thrombin at 0.5 U/ml in presence of 1 mM of CaCl<sub>2</sub>. Fluorescence of Fluo4 measured at 535 nm. Values are expressed by percentage of fluorescence of Fluo4 and the data represent the mean  $\pm$  SEM (n=6-8).



**Figure E2: No difference between the cytokines carried by  $MVs^{nmMLCK+/+}$  and  $MVs^{nmMLCK-/-}$ .**

(A). Template showing location of antibodies for cytokines spotted onto RayBiotech cytokine antibody array kit (62 cytokines). Each spot on the membrane represents one cytokine. (B). Image of membranes of antibody array screening using for analysis of cytokines carried by MVs. 1ml of  $MVs^{nmMLCK+/+}$  or  $MVs^{nmMLCK-/-}$  ( $2300 \pm 202$  MVs/ $\mu$ l) was incubated with cytokine antibody membrane represented in (A) according to the manufacturer's protocol. The cytokine was detected with anti-cytokine secondary peroxidase-conjugated antibody. The spots with high intensity (fluorescent spot) show positive control whereas the no signal spots (dark spot) represent negative control. (C). AoECs were treated for 24 hours with LPS alone (10 $\mu$ g/ml),  $MVs^{nmMLCK+/+}$  ( $2300 \pm 202$  MVs/ $\mu$ l),  $MVs^{nmMLCK-/-}$  ( $3000 \pm 562$  MVs/ $\mu$ l), LPS +  $MVs^{nmMLCK+/+}$  or LPS +  $MVs^{nmMLCK-/-}$ . We show here image of membranes of antibody array

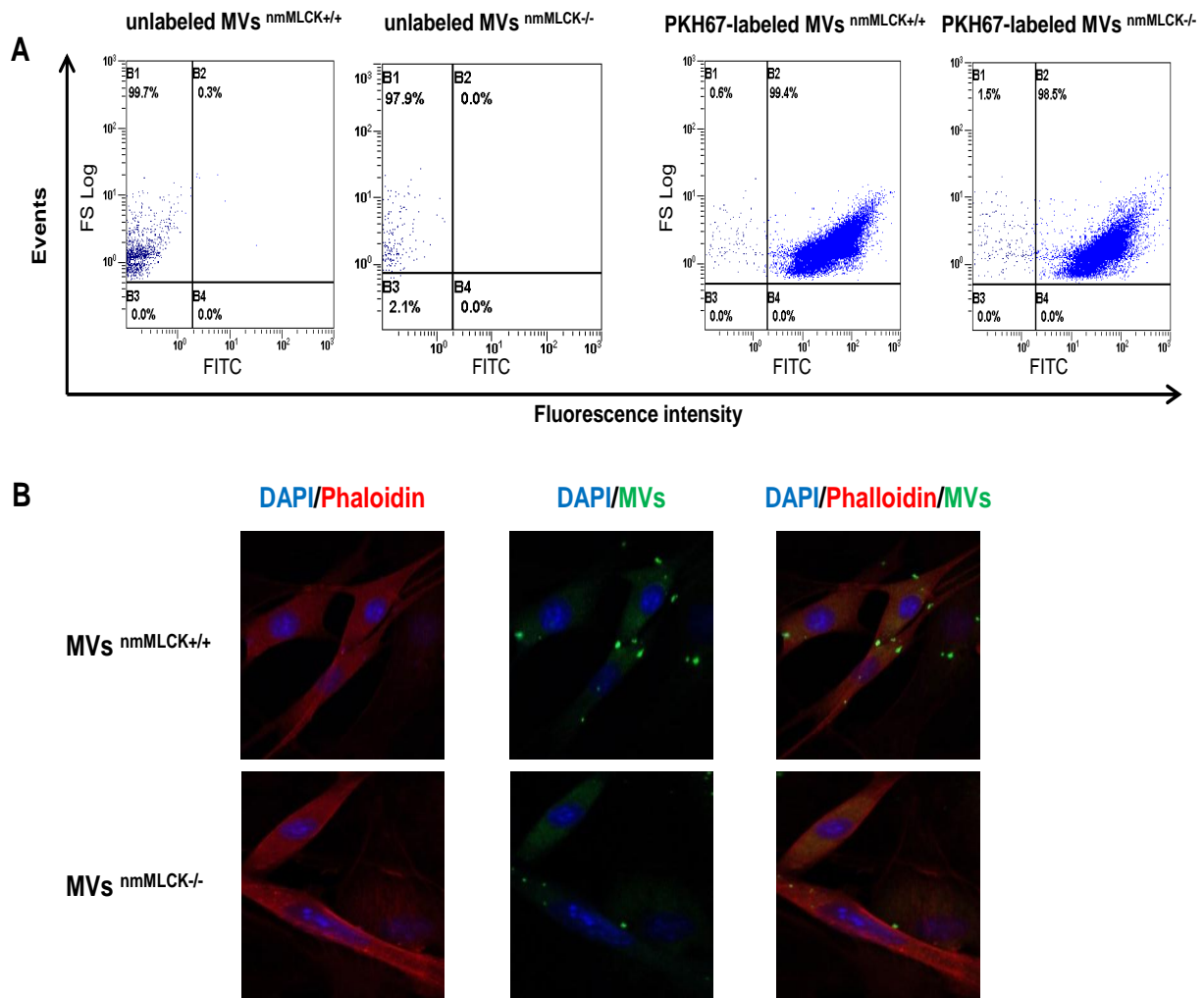
screening using for cytokines analysis. The image intensity was measured on imager Vilber Lourmat and the resulting images was analyzed using Image J software.



**Figure E3: Nitration of proteins in AoECs.**

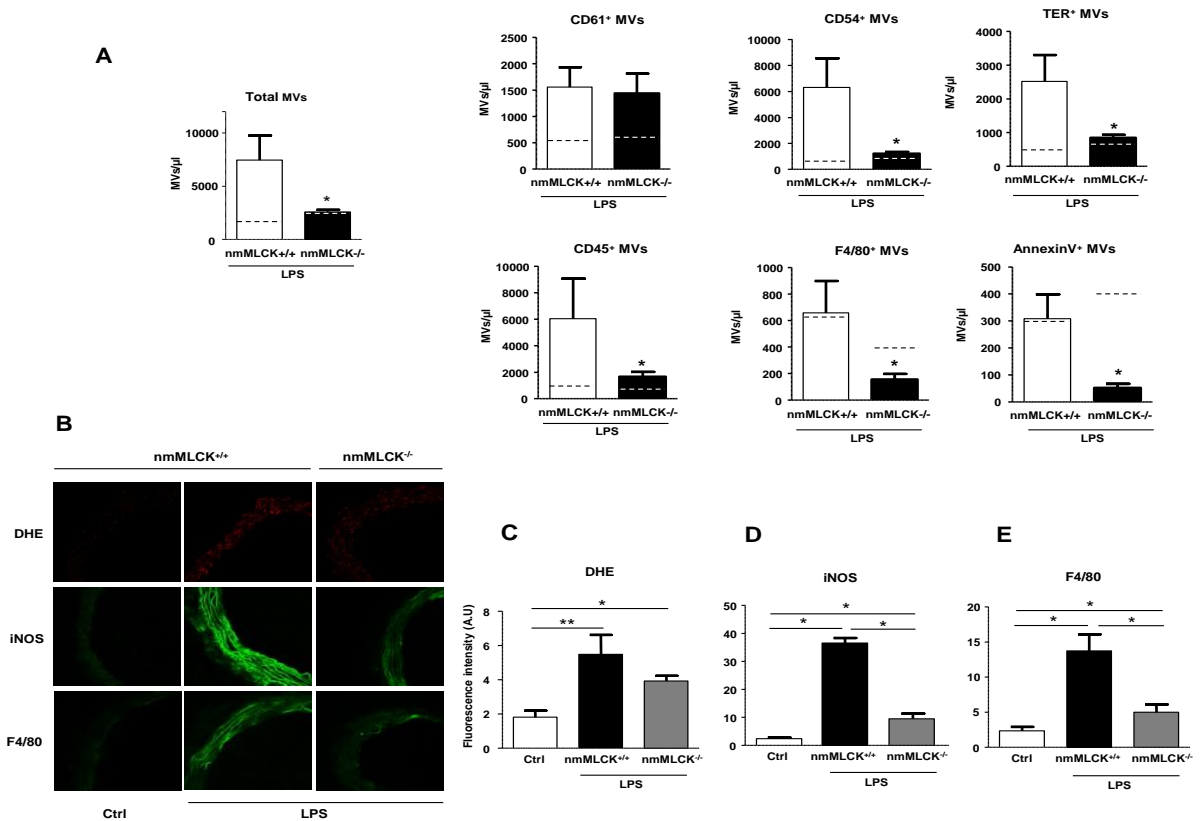
AoECs were treated for 24 hours with saline salt solution (Ctrl), LPS (10  $\mu$ g/ml),  $s^{nmMLCK+/+}$  (2300 $\pm$ 202 MVs/ $\mu$ l),  $MVs^{nmMLCK-/-}$  (3000 $\pm$ 562 MVs/ $\mu$ l) or combined treatment LPS+MV<sub>s</sub> ( $MVs^{nmMLCK+/+}$  or  $MVs^{nmMLCK-/-}$ ).

The protein nitration was evaluated in treated AoECs by Western blot using antibody raised against nitrotyrosine-modified proteins. Bound antibodies were detected with anti-mouse secondary peroxidase-conjugated antibody (1:5000, Promega, Madison, WI). We observe strong nitration at molecular weight lower than 42 kDa.



**Figure E4: Internalization of circulating MVs in AoECs.**

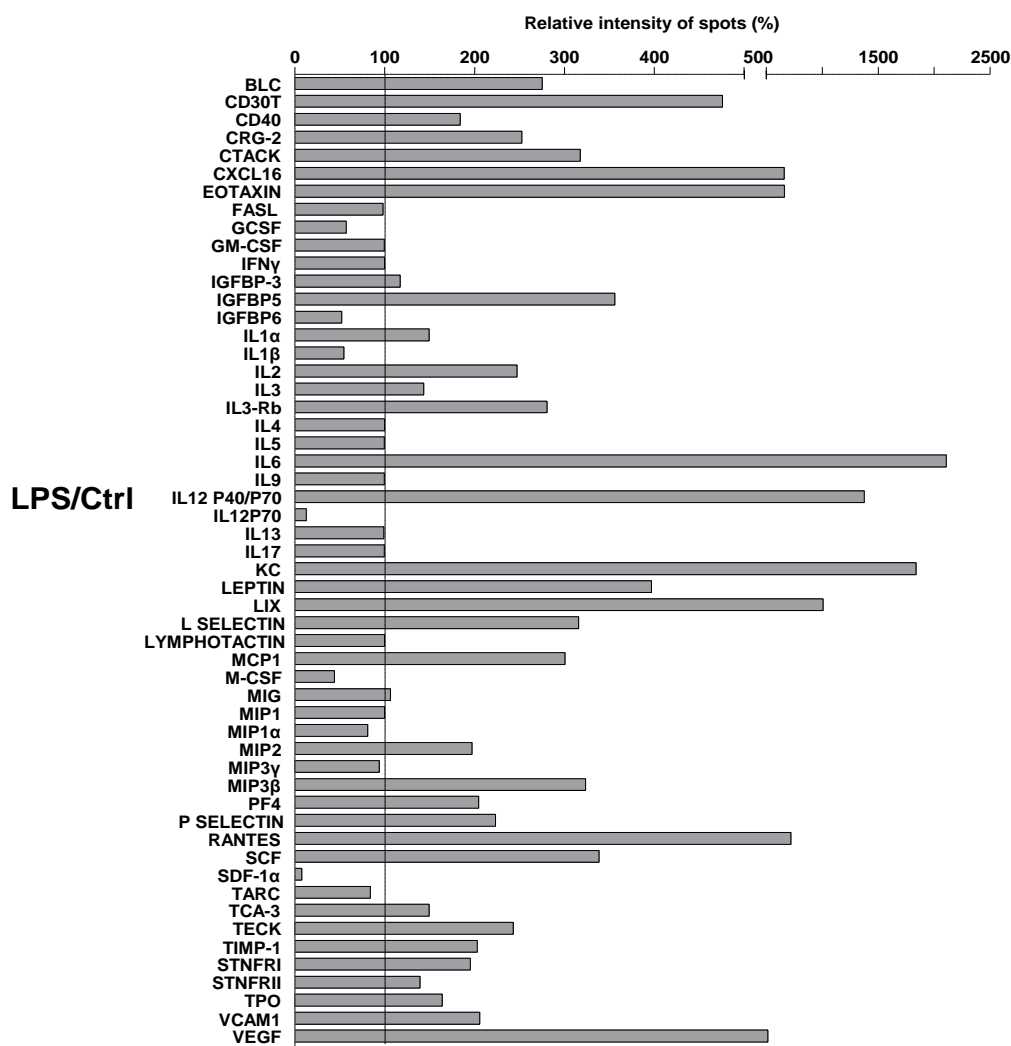
(A). Isolated MVs<sup>nmMLCK+/+</sup> and MVs<sup>nmMLCK-/-</sup> were labeled with 2 mM PKH67 (Sigma Aldrich) dye in 0.9% saline solution. Once stained, fluorescence was measured by flow cytometry. Regions corresponding to MVs were identified by FSC and SSC intensity. FITC fluorescence intensity was also evaluated. We showed dot plots of unlabeled and PKH67-labeled MVs. (B). Confocal images showing AoECs (Actin filaments staining phalloidin, red); (nuclei staining DAPI, blue) incubated at 37°C with 10 mg/ml of MVs labeled with PKH67. Both PKH67-labeled MVs<sup>nmMLCK+/+</sup> (green) and PKH67-labeled MVs<sup>nmMLCK-/-</sup> (green) are internalized into AoECs after 24 hours of incubation (see supplemental Methods for details).



**Figure E5: nmMLCK<sup>-/-</sup> mice are partially protected against changes on MV levels and vascular inflammation induced by LPS.**

(A). MVs were collected from blood circulation of nmMLCK<sup>+/+</sup> and nmMLCK<sup>-/-</sup> mice treated intraperitoneally with LPS (40mg/Kg) for 4 hours. Histograms show total circulating MVs and platelet-(CD61<sup>+</sup>), endothelial cell-(CD54<sup>+</sup>), erythrocyte-(TER119<sup>+</sup>), leukocyte-(CD45<sup>+</sup>), macrophage-(F4/80<sup>+</sup>), and procoagulant-(annexin V<sup>+</sup>), derived MVs. Dotted line represents the rate of MVs in untreated mice. Values are expressed as events per μl and the data represent the mean ±SEM (n=3-4) \*p<0.05. (B). Confocal image staining of superoxide anion production by dihydroethidine (DHE) (red), nitric oxide synthase (iNOS) (green), and macrophage infiltration (F4/80 green) in thoracic aorta from nmMLCK<sup>+/+</sup> and nmMLCK<sup>-/-</sup> mice injected intraperitoneally by LPS (40 mg/kg) for 4 hours (see Materials and Methods for details). (C-E). Histograms show fluorescence intensity (A.U.), of aorta DHE staining (C),

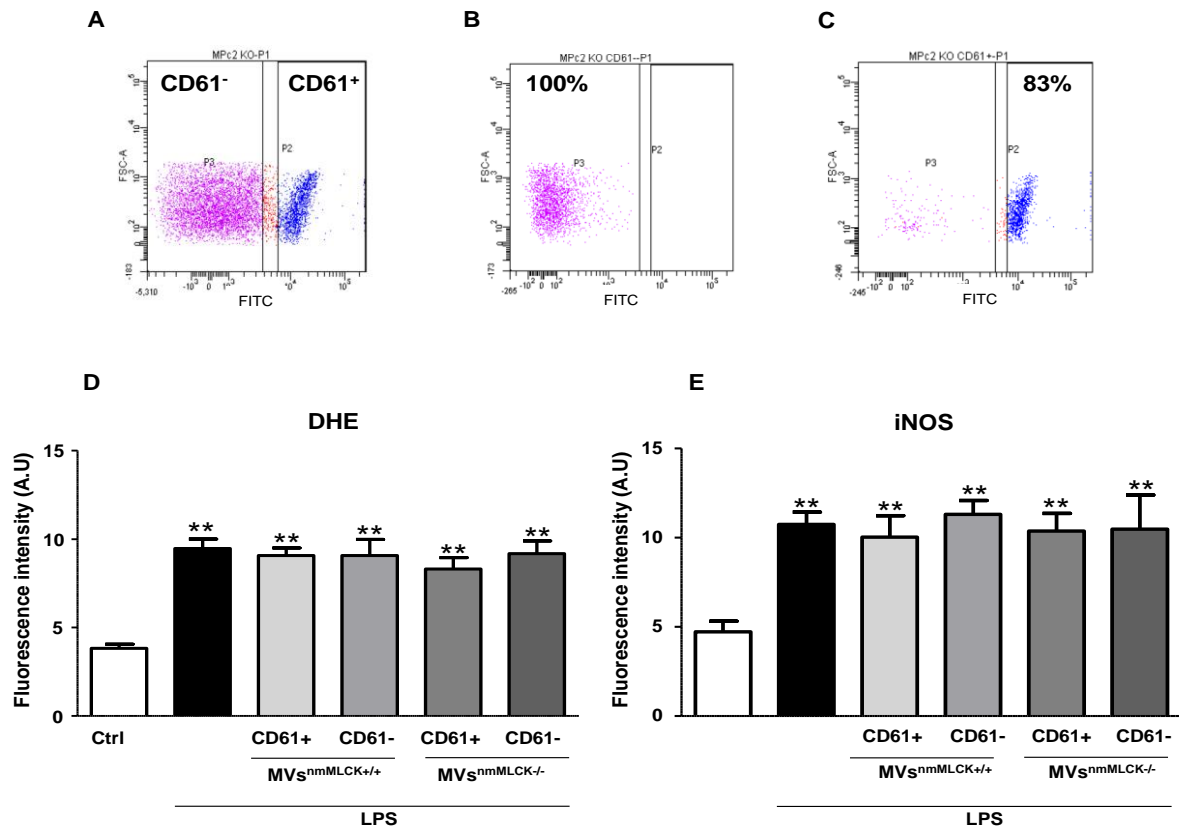
iNOS (D) and F4/80 (E), assessed by Image J. Data are expressed by fluorescence intensity (A.U) and represent the mean  $\pm$ SEM (n=3) \*p<0.05, \*\*p<0.01.



**Figure E6: LPS increased inflammatory cytokines production on mouse AoECs.**

Analysis of the inflammatory cytokine production by AoECs treated with LPS (10  $\mu$ g/ml) for 24 hours by antibody array screening (same protocol of figure 2S). Histograms show the cytokine ratio between either LPS treated *versus* non-treated cells. Black line represents no change in cytokine production between treatments. Results are expressed as a percentage of relative intensity of spots (%).





**Figure E7: All subtypes of MVs are needed to induce vascular protection.**

Separation between circulating MVs<sup>CD61+</sup> and circulating MVs<sup>CD61-</sup> was realised by Flow cytometry (see supplemental Methods for details).

(A). Dot plot of circulating MVs after incubation with anti-CD61 antibody. We have two populations of MVs, MVs CD61<sup>+</sup> (FITC fluorescent MVs) and MVs CD61<sup>-</sup>. (B). Dot plot of circulating MVs after separation between circulating MVs<sup>CD61+</sup> and circulating MVs<sup>CD61-</sup>. 100% of collected MVs were CD61<sup>-</sup>. (C). Dot plot of circulating MVs after separation. 83% of MVs were CD61<sup>+</sup>. (D, E). Aorta of wild type mice was incubated *ex vivo* for 24 hours with LPS alone (10µg/ml), LPS +MV<sup>nmMLCK+/+</sup>CD61<sup>+</sup>, LPS +MV<sup>nmMLCK+/+</sup>CD61<sup>-</sup> or LPS +MV<sup>nmMLCK-/-</sup>CD61<sup>+</sup>, LPS+ MV<sup>nmMLCK-/-</sup>CD61<sup>-</sup>. Histograms show fluorescence intensity (A.U), of aorta DHE staining (D), iNOS expression (E), assessed by Image J. Data represent the mean ± SEM (n=4) \*\*p<0.01.

## **Expanded view: METHODS**

### **Animals**

All animal care and treatment procedures were performed in accordance with institutional guidelines and protocols were approved by the French Animal Care Committee in accordance with European regulations (CEE/PdL2012.94). This study was performed in male C57BL/6 (8-week-old) nmMLCK<sup>+/+</sup> and nmMLCK<sup>-/-</sup> mice generated by selective exon targeting (9).

### **Circulating MV isolation**

Circulating MVs were isolated from peripheral blood by cardiac puncture collected in EDTA tubes (Vacutainers, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) from mice. Blood was centrifuged (1,500g, 5 minutes) and platelet-rich plasma (PRP) was separated from whole blood. Then, PRP was centrifuged (1,900g, 5 minutes) to obtain platelet-free plasma (PFP). Sixty µl of PFP were frozen and stored at -80°C until subsequent use. In order to pellet MVs for *in vitro* and *in vivo* studies, circulating MVs were concentrated from PFP by three series of centrifugations (16,000g, 45 minutes), resuspended in 150µl of 0.9% NaCl and stored at 4°C. The physiological circulating concentration of mouse MVs was used for *in vitro* and *in vivo* studies, whereas the control conditions correspond to treatment by 0.9% NaCl. For MVs taken from wild type animals (MV<sup>nmMLCK+/+</sup>), we used: 2300±202 MVs/µl which corresponds to 207±50 µg of proteins/ml and, for MVs taken from nmMLCK deficient mice (MV<sup>nmMLCK-/-</sup>) 3000±562 MVs/µl which corresponds to 154±34 µg of proteins/ml. These values in protein concentration were not statistically different.

### **Characterization of the size of MVs**

Two µl of MVs were diluted with 300µl of 0.9% NaCl and analyzed with Malvern Zetasizer. This unit measures particle size and molecules below a nanometer up to several microns by using the dynamic light scattering. It also measures the zeta potential and electrophoretic

mobility by laser Doppler electrophoresis and the molecular weight by the static light scattering.

### **Characterization of the zeta potential of MVs**

Two  $\mu\text{l}$  of concentrated MVs were diluted with 300  $\mu\text{l}$  of mili-Q water and the zeta potential was analyzed with Malvern Zetasizer.

### **Characterization of MV phenotype**

Regions corresponding to total MVs were identified in FSC and SSC intensity dot plot representation set at logarithmic gain, depending on their diameter (0.1-1  $\mu\text{m}$ ). MV subpopulations were discriminated according to the expression of membrane specific antigens by flow cytometer. MVs derived from platelets, erythrocytes, leukocytes, endothelial cells, and macrophages were labeled using anti-CD61, TER119, anti-CD45, anti-CD54, F4/80 antibodies, respectively. Anti-CD133 and Sca1 antibodies were used to identify progenitor-derived MVs (Biolegend, London, UK). Annexin-V (Beckman Coulter, Villepinte, France) binding was used to label phosphatidylserine. Eight  $\mu\text{l}$  of PFP was incubated with 1  $\mu\text{l}$  of a specific antibody (Beckman Coulter). After 45 minutes of incubation, samples were diluted in 200  $\mu\text{l}$  of 0.9% NaCl or annexin-V labeling buffer and flow count beads (8  $\mu\text{l}$ ) were added to samples (8  $\mu\text{l}$ ) to measure MV concentration. Irrelevant mouse IgG was used as an isotype-matched negative control for each sample. Samples were analyzed in a flow cytometer 500 MPL System (Beckman Coulter). Sample analysis was stopped after the count of 10,000 events.

### **Counting of circulating cells**

An automated cell count analyzer (Beckmann Coulter) was used to perform blood cell count. Progenitor cells were determined by incubating peripheral blood mononuclear cells (20  $\mu\text{l}$ ) with anti-CD133 and Sca1 antibodies (1  $\mu\text{l}$ ) for 45 minutes. After incubation, samples were

diluted in 200  $\mu$ l of 0.9% NaCl and analyzed in a flow cytometer 500 MPL System (Beckman Coulter).

### ***In vitro* platelet budding in response to thrombin**

Platelets were isolated from peripheral blood by cardiac puncture collected in citrate tubes (Becton Dickinson) from nmMLCK<sup>+/+</sup> and nmMLCK<sup>-/-</sup> mice. Blood was centrifuged at 150g for 10 minutes and platelet-rich plasma was separated from whole blood. Then, platelet-rich plasma was centrifuged at 1,500g for 10 minutes in order to pellet platelets. After that, platelets were resuspended in 1ml of Ca<sup>2+</sup>-free solution. Isolated platelets from nmMLCK<sup>+/+</sup> and nmMLCK<sup>-/-</sup> mice ( $2 \times 10^6$  platelets) were activated *in vitro* by thrombin at 0.1U/ml for 10 minutes at 37°C in presence of 0.05M of CaCl<sub>2</sub>. Platelet-derived MVs were prepared by successive centrifugations and counted by flow cytometry as described above.

### **Isolation of aortic endothelial cells**

Primary endothelial cells were isolated from mouse aorta (AoECs) by using from the protocol of Kobayashi and colleagues (10, 11). Cells were treated for 24 hours with MVs at circulating levels detected in the plasma of mice, in the absence or presence of lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) (10 $\mu$ g/ml).

Briefly, mice are anesthetized with isoflurane and the midline of the abdomen is incised. The thorax is opened to expose the heart lungs and the abdominal aorta, which is cut at the middle to release the blood, and then perfused with 1 ml of PBS containing 1,000 U/ml of heparin from the left ventricle. The aorta is dissected out from the aortic arch to the abdominal aorta, and immersed in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) containing 20% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin, streptomycin). The fat or connecting tissue is rapidly removed with fine forceps under a microscope. A 24- gauge cannula is inserted into the proximal portion of the aorta. After ligation at the site with a silk thread, the inside of the lumen is briefly washed with serum-free DMEM. The other side is bound and filled with

collagenase type II solution (2 mg/ml, dissolved in serum-free DMEM). After incubation for 45 minutes at 37°C, AoECs are removed from the aorta by flushing with 5 ml of DMEM containing 20% FBS 1% antibiotics and cells are collected by centrifugation at 1,200 rpm for 5 minutes. The precipitate is gently re-suspended by pipette with 2 ml of 20% FBS-1% antibiotics- DMEM and cultured in a 35 mm collagen type I-coated dish. To remove smooth muscle cells, after 2 h incubation at 37°C, the medium is removed, the cells are washed with warmed PBS, and EBM2 (Endothelial cell Basal Medium-2) with 5% FBS and 1% antibiotics is added.

### **Cytokine production**

Cytokine production was evaluated by Ray Bio Mouse Cytokine Antibody Array 3 kit. Production of IL-6 and MCP-1 was evaluated by mouse ELISA (Ray Biotech, Atlanta, GA) (see for more information for details). Cytokine production was evaluated in cell supernatant of AoECs treated with MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup>, MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>, LPS (10 µg/ml), and LPS with MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> or MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>. The image intensity was measured on imager Vilber Lourmat (Torcy, France) and the resulting images was analyzed using Image J software.

### **Vascular reactivity**

Thoracic aorta was isolated from nmMLCK<sup>+/+</sup> mice treated intravenously for 24 hours with MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> or MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>. Aorta was carefully cleaned of adhering fat and connective tissue and then cut into rings (1.5-2 mm length). Aorta rings were mounted on a wire myograph filled with PSS buffer to record isometrical mechanical activity, as previously described (3). The experiments were performed at 37°C with PSS continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Arteries were precontracted to 80% of maximal contraction with the thromboxane A<sub>2</sub> analog, 9,11-dideoxy-9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -methanepoxyPGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (U-46619, Merck Chemicals Ltd, Nottingham, UK) and endothelium-dependent relaxation was assessed by cumulative addition of acetylcholine (1 nM-10 µM). Neither MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> nor MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>

did induce differences in the levels of precontraction induced by U-46619, which attest the absence of LPS contamination on MV preparation.

### **Staining and imaging of aorta wall by confocal microscopy**

Aorta rings derived from nmMLCK<sup>+/+</sup> mice were treated *ex vivo* with MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup>, MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>, LPS (10µg/ml) and LPS with MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> or MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>, for 24 hours in DMEM, 20% FBS, 1% antibiotic medium. In another set of experiments, nmMLCK<sup>+/+</sup> mice were intravenously injected by MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> or MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> for 24 hours and thoracic aorta was isolated. Then, vessels were frozen and cut in 10µm sections. After fixation, aorta sections were incubated 2 hours at room temperature in blocking buffer (5% nonfat dry milk in PBS) followed by three washes in PBS buffer. Tissue sections were incubated overnight (4°C) with anti-inducible nitric oxide synthase (iNOS) (1:50, BD Biosciences, San José, CA), anti-nitrotyrosine (1:100, clone 1A6, Millipore, Billerica, MA), and anti-macrophage marker (F4/80) (1:100, Biolegend) antibodies. After three washes, aorta rings were incubated one hour at room temperature with Alexa fluor 488-labeled antibody (1:100, Interchim, Montluçon, France). In another set of experiments, the *in situ* production of superoxide anion was evaluated by the fluorescent dye dihydroethidine (DHE, Sigma-Aldrich, 3µmol/l, 30 minutes in the dark). After washes, sections were mounted on glass slides and visualized with a confocal microscopy (CLMS 700, Zeiss, ZEN software).

### **Western Blot Analysis**

Proteins (40µg) were separated using NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel, and then transferred to nitrocellulose membrane. Blots were probed with anti-nitrotyrosine, and anti-β-actin (1:5000, Sigma-Aldrich) antibodies. Bound antibodies were detected with anti-mouse secondary peroxidase-conjugated antibody (1:5000, Promega, Madison, WI). The bands were visualized using the enhanced chemiluminescence system (Amersham, Buckinghamshire, UK) and quantified by densitometry.

### **Griess assay**

AoECs were treated *in vitro* with MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup>, MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup>, LPS (10 µg/ml), or the combination LPS with MVs for 24 hours. The culture medium (100 µl) was collected and mixed with 100 µl Griess reagent (Sigma-Aldrich) and nitrate reductase (20 µl of 10 U/ml nitrate reductase). After 15 minutes of incubation in the dark at room temperature, absorbance of colorimetric product was measured in each well at 570 nm by use of a Mithras LB940 spectrophotometer (Berthold Technologies, Thoiry, France). Concentrations of nitrite and nitrate were determined using a curve of nitrite standard solution.

### **Internalization of MVs into endothelial cells**

Briefly, isolated MVs were labeled with 2 mM PKH67 dye (Sigma Aldrich) in 0.9% NaCl for 2 min at room temperature. An equal volume of fetal bovine serum was added to stop staining. Then, MVs were centrifuged at 16,000 g for 45 minutes to remove the supernatant. PKH67-labeled MVs were incubated with mouse aortic endothelial cells (AoECs) for 24 hours at 37°C. After incubation, cells were fixed with 2% paraformaldehyde for 20 minutes and then they were stained with phalloidin (50 mg/ml, Sigma Aldrich) for 90 minutes at room temperature. After washing with PBS, nuclei were stained with DAPI and washed again. Finally, cells were mounted and visualized with confocal microscopy (CLMS700, Zeiss, ZEN software). All images were acquired using x63 objective. Cells incubated with unlabeled MVs served as a control.

### **Measurement of intracellular calcium in platelets in response to thrombin stimulation**

Platelets were isolated and washed from blood by centrifugation. Platelets were resuspended in 1ml of Ca<sup>2+</sup>-free solution. Isolated platelet from nmMLCK<sup>+/+</sup> and nmMLCK<sup>-/-</sup> mice (2x10<sup>6</sup> platelets) were incubated with calcium probe Fluo4 (3 µM) for 45 min at 37°C and then, they were activated by thrombin at 0.5 U/ml in presence of 1mM of CaCl<sub>2</sub>. Fluorescence of Fluo4 was measured at 535 nm by spectrophotometer Mithras LB940 Multimode Reader.

### **Separation between circulating MVs<sup>CD61+</sup> and circulating MVs<sup>CD61-</sup>**

Separation between circulating MVs<sup>CD61+</sup> and circulating MVs<sup>CD61-</sup> was realised by Flow cytometry. Fifty µl of circulating MVs<sup>nmMLCK<sup>-/-</sup></sup> or MVs<sup>nmMLCK<sup>+/+</sup></sup> were incubated with 3 µl of anti-CD61 antibody (Biolegend, London, UK). After 45 min of incubation, 250 µl of 0.9%NaCl were added. The sample was analysed by flow cytometry BP FACS Aria<sup>TM</sup> Cell Sorter. Regions corresponding to total MVs were identified in FSC and SSC intensity dot plot representation set at logarithmic gain, depending on their diameter (0.1-1 µm). We have two populations of MVs, MVs CD61+ (FITC fluorescent MVs) and MVs CD61- (non-fluorescent MVs). After separation, MVs were analysed on flow cytometer to evaluate percentage of separation.



## REFERENCES

1. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005; 365: 63-78.
2. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 536-545.
3. Ralay Ranaivo H, Carusio N, Wangenstein R, Ohlmann P, Loichot C, Tesse A, Chalupsky K, Lobysheva I, Haiech J, Watterson DM, Andriantsitohaina R. Protection against endotoxic shock as a consequence of reduced nitrosative stress in MLCK210-null mice. *Am J Pathol* 2007; 170: 439-446.
4. Verin AD, Lazar V, Torry RJ, Labarrere CA, Patterson CE, Garcia JG. Expression of a novel high molecular-weight myosin light chain kinase in endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 758-766.
5. Signorello MG, Giacobbe E, Passalacqua M, Leoncini G. The 2-arachidonoylglycerol effect on myosin light chain phosphorylation in human platelets. *Biochimie* 2013; 95: 1620-1628.
6. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000; 95: 930-935.
7. Fujimi S, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Hosotsubo H, Nakamori Y, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H. Activated polymorphonuclear leukocytes enhance production of leukocyte microparticles with increased adhesion molecules in patients with sepsis. *J Trauma* 2002; 52: 443-448.

8. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, Asfar P, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 1148-1155.
9. Wainwright MS, Rossi J, Schavocky J, Crawford S, Steinhorn D, Velentza AV, Zasadzki M, Shirinsky V, Jia Y, Haiech J, Van Eldik LJ, Watterson DM. Protein kinase involved in lung injury susceptibility: evidence from enzyme isoform genetic knockout and in vivo inhibitor treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6233-6238.
10. Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, Minami T, Kodama T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12: 138-142.
11. Tual-Chalot S, Guibert C, Muller B, Savineau JP, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 261-268.
12. Kudryashov DS, Stepanova OV, Vilitkevich EL, Nikonenko TA, Nadezhdina ES, Shanina NA, Lukas TJ, Van Eldik LJ, Watterson DM, Shirinsky VP. Myosin light chain kinase (210 kDa) is a potential cytoskeleton integrator through its unique N-terminal domain. *Exp Cell Res* 2004; 298: 407-417.
13. Brown M, Adyshev D, Bindokas V, Moitra J, Garcia JG, Dudek SM. Quantitative distribution and colocalization of non-muscle myosin light chain kinase isoforms and cortactin in human lung endothelium. *Microvasc Res* 2010; 80: 75-88.

14. Wraith KS, Magwenzi S, Aburima A, Wen Y, Leake D, Naseem KM. Oxidized low-density lipoproteins induce rapid platelet activation and shape change through tyrosine kinase and Rho kinase-signaling pathways. *Blood* 2013; 122: 580-589.
15. Itoh K, Hara T, Yamada F, Shibata N. Diphosphorylation of platelet myosin ex vivo in the initial phase of activation by thrombin. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1136: 52-56.
16. Shin JW, Swift J, Ivanovska I, Spinler KR, Buxboim A, Discher DE. Mechanobiology of bone marrow stem cells: from myosin-II forces to compliance of matrix and nucleus in cell forms and fates. *Differentiation* 2013; 86: 77-86.
17. Shen Q, Rigor RR, Pivetti CD, Wu MH, Yuan SY. Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. *Cardiovasc Res* 2010; 87: 272-280.
18. Eutamene H, Theodorou V, Schmidlin F, Tondereau V, Garcia-Villar R, Salvador-Cartier C, Chovet M, Bertrand C, Bueno L. LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability: role of MLCK. *Eur Respir J* 2005; 25: 789-796.
19. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 2001; 15: 825-835.
20. Wen B, Combes V, Bonhoure A, Weksler BB, Couraud PO, Grau GE. Endotoxin-induced monocytic microparticles have contrasting effects on endothelial inflammatory responses. *PLoS One* 2014; 9: e91597.
21. Eyre J, Burton JO, Saleem MA, Mathieson PW, Topham PS, Brunskill NJ. Monocyte- and Endothelial-Derived Microparticles Induce an Inflammatory Phenotype in Human Podocytes. *Nephron Exp Nephrol* 2011; 119: e58-e66.

22. Buesing KL, Densmore JC, Kaul S, Pritchard KA, Jarzembowski JA, Gourlay DM, Oldham KT. Endothelial microparticles induce inflammation in acute lung injury. *J Surg Res* 2011; 166: 32-39.
23. Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* 2004; 104: 2543-2548.
24. Dalli J, Norling LV, Renshaw D, Cooper D, Leung KY, Perretti M. Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood* 2008; 112: 2512-2519.
25. Dalli J, Norling LV, Montero-Melendez T, Federici Canova D, Lashin H, Pavlov AM, Sukhorukov GB, Hinds CJ, Perretti M. Microparticle alpha-2-macroglobulin enhances pro-resolving responses and promotes survival in sepsis. *EMBO Mol Med* 2014; 6: 27-42.
26. Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R, Martínez MC. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* 2009; 30: 580-588.
27. Benameur T, Soleti R, Porro C, Andriantsitohaina R, Martínez MC. Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS One* 2010; 5: e12688.

# **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

L'objectif général de ce travail de thèse était d'évaluer :

- d'une part le rôle de la protéine MLCKnm au niveau du mécanisme de libération et de bourgeonnement des MPs circulantes (Objectif 1)
- d'autre part, d'évaluer le rôle de MLCKnm au niveau du message biologique porté par les MPs et par conséquent leurs effets sur les cellules cibles. (Objectif 2).

Pour atteindre nos objectifs, nous avons fait appel à une stratégie de délétion totale de la protéine MLCKnm chez la souris. Nous avons évalué l'effet de la délétion de MLCKnm, sur le taux circulant, l'origine cellulaire, et les propriétés physiques des MPs circulantes (objectif 1). En outre, sur les effets inflammatoires des MPs circulantes *in vitro* *ex vivo* et *in vivo* (objectif 2).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à évaluer l'effet de la délétion de MLCKnm sur le nombre et l'origine cellulaire des MPs circulantes. Il est bien connu que la désorganisation du cytosquelette représente une étape essentielle dans le processus de génération des MPs. Il a été précédemment démontré, une diminution de la quantité de MPs circulantes, au niveau des souris transgéniques sur-exprimant la calpastatine, un inhibiteur de la calpaïne, qui est une cystéine protéase nécessaire au remodelage du cytosquelette et la libération des MPs circulantes (Zafrani et al, 2012). De même, l'utilisation des inhibiteurs de p38 MAPK pour lutter contre l'inflammation vasculaire permet de prévenir la formation de MPs endothéliales induite par le TNF $\alpha$ , et expliquer en partie l'effet bénéfique de ces inhibiteurs (Curtis et al, 2009). Dans notre travail de thèse, la délétion de MLCKnm augmente le nombre total des MPs circulantes. L'augmentation du nombre des MPs circulantes n'est pas dû à la diminution de leur clairance, puisque les résultats d'internalisation dans les cellules cibles montrent que les MPs<sup>MLCKnm+/+</sup>, et les MPs<sup>MLCKnm-/-</sup> interagissent de la même manière avec les cellules endothéliales. De plus, le phénotype MLCKnm-/- ne présente aucune

anomalie fonctionnelle qui témoigne d'un défaut de la clairance sanguine (Ohlmann et al., 2005). En revanche, nos résultats peuvent être expliqués par la probable participation de MLCKnm au niveau de la formation et la libération des MPs circulantes. Pour justifier cette hypothèse, il est connu que l'activation de MLCKnm par le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /CAM conduit à une contraction du cytosquelette cellulaire suite à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine MLC-2 au niveau de Ser-19 et Thr-18, qui favorise le mouvement contractile contre l'actine. Cette contraction pourrait participer à la génération d'une force centripète qui limite l'expulsion de la MP à partir de la surface cellulaire. En outre, il a été montré que MLCKnm interagit physiquement avec la cortactine (une protéine du cytosquelette impliquée dans plusieurs structures corticales telles que les lamellipodes) dans les cellules endothéliales et module ainsi l'organisation du cytosquelette (Kudryashov et al, 2004). Grâce à son extrémité N-terminale, MLCKnm sert d'échafaudage pour l'ensemble des protéines du système de cytosquelette, favorisant ainsi leurs activations et le déclenchement du mécanisme de libération des MPs. En absence de MLCKnm, il y aura probablement un défaut d'assemblage et d'activation des protéines du cytosquellette par conséquent un défaut dans le mécanisme de bourgeonnement des MPs ce qui peut expliquer l'augmentation du nombre de MPs libérées.

Parallèlement à ces résultats, nous avons montré une augmentation de la taille avec une diminution de la charge négative des MPs issues des souris KO MLCKnm. Ces effets sont probablement dus à l'altération du mécanisme de génération des MPs. Toujours par sa fonction d'induire la contraction de cytosquelette, et en sachant que les MPs pouvaient contenir des résidus du cytosquelette, MLCKnm pourrait participer au bourgeonnement des MPs et déterminer une taille bien précise de 0,1 à 1  $\mu\text{m}$ .

En effet, des résultats obtenus in vitro sur des plaquettes isolées viennent consolider notre conclusion précédente sur le rôle probable que joue MLCKnm dans le bourgeonnement des MPs. Il est mis en évidence que MLCKnm est exprimée au niveau des plaquettes et que son

activation conduit à la contraction du cytosquelette et la modification de la morphologie plaquettaires (Wraith et al 2013). En outre, Itoh et al. (1992) ont montré que la phosphorylation de la myosine par MLCKnm joue un rôle dans la phase initiale d'activation plaquettaire en réponse à la thrombine *in vivo*. Sur la base de ces études, nous avons démontré que la délétion de MLCKnm n'affecte pas l'activation des plaquettes (augmentation du calcium intracellulaire) en réponse à la thrombine. En revanche, les plaquettes déplétées en MLCKnm présentent un défaut de bourgeonnement, observé par une diminution de la libération des MPs après stimulation par la thrombine. L'ensemble de ces résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* ont permis de suggérer pour la première fois, le rôle de MLCKnm au niveau du mécanisme de génération et bourgeonnement des MPs circulantes.

Comme il a été décrit précédemment, une diminution de l'activité de la calpaïne diminue le nombre de MPs quelle que soit leur origine cellulaire. Dans le cas de MLCKnm, la délétion diminue spécifiquement le nombre de MPs dérivées des leucocytes et macrophages. D'une manière intéressante, ces observations sont corrélées à une diminution du nombre des leucocytes dans la circulation, qui pourrait être à l'origine de la diminution des MPs leucocytaires. Ces résultats suggèrent qu'en plus du rôle probable de MLCKnm dans le mécanisme de génération des MPs, elle pourrait participer aussi à la maturation des leucocytes au niveau de la moelle osseuse ce qui explique la diminution du nombre des leucocytes circulantes chez les souris KO MLCKnm. Il a été rapporté qu'en plus de l'interaction actine myosine, MLCKnm participe à la régulation de la barrière vasculaire, et la diapédèse des leucocytes. Il est peu probable que la diminution du nombre de leucocytes observée dans notre étude chez les souris KO MLCKnm soit due à une diminution de passage des leucocytes matures de la moelle osseuse vers la circulation générale puisque le nombre des cellules circulantes progénitrices dérivées de la moelle osseuse était inchangé entre les souris sauvage et KO MLCKnm. Cependant, il est possible que la maturation des cellules



progénitrices de leucocytes soit affectée dans la moelle osseuse suite à la délétion de MLCKnm. Suivant ce sens de raisonnement, il existe des résultats intéressants dans la littérature suggérant toute une nouvelle fonction de MLCKnm dans la différenciation et la spécification des fonctions des cellules souches de la moelle osseuse. Le processus est expliqué par le fait que l'activation de MLCKnm au niveau des cellules souches conduit à la contraction du cytosquelette cellulaire ce qui définit son interaction avec les cellules stromales et la matrice extracellulaire. Ce phénomène est connu sous le nom du « Homing » des cellules souches hématopoïétiques. Cette interaction entre la cellule souche et son environnement médiée par l'activation de MLCKnm détermine le devenir et la fonction de la cellule souche au niveau de la moelle osseuse (Shin et al, 2013). Cependant, dans notre travail, cette hypothèse reste à étudier.

Il est intéressant de noter qu'il n'existe pas d'étude scientifique qui explique le fait que la délétion de MLCKnm affecte seulement le nombre des leucocytes et le bourgeonnement des plaquettes sans affecter les autres types cellulaires. Cependant, ces résultats dévoilent l'importance de la protéine MLCKnm au niveau de ces deux types cellulaires.

La première partie de la thèse, nous a permis d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche très intéressante et de révéler de probable nouvelles fonctions émergentes de la protéine MLCKnm au niveau du mécanisme de production des MPs mais aussi au niveau de la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse. Par contre, il serait très intéressant de poursuivre ce travail avec une étude à l'échelle moléculaire afin de positionner l'emplacement et le rôle exacte de MLCKnm au niveau de ces deux processus. En réalisant des expériences de coimmunoprécipitation et des études in vitro sur le bourgeonnement des MPs et la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse en présence et en absence d'inhibiteur pharmacologique de MLCKnm. Ainsi, pour bien compléter l'étude il serait préférable de caractériser les différentes populations de cellule souche au niveau de la moelle

osseuse des souris MLCKnm<sup>-/-</sup> et étudier leur différenciation et maturation par rapport à des cellules souches issues des souris sauvages. Ces résultats pourraient présenter la base d'une nouvelle piste de recherche, afin d'améliorer nos connaissances sur le rôle de MLCKnm et de trouver une nouvelle cible thérapeutique.

Dans un second temps, afin d'évaluer si la délétion de MLCKnm modifie le message inflammatoire porté par les MPs, une étude fonctionnelle des propriétés inflammatoires des MPs circulantes issues des souris sauvages ou KO MLCKnm a été réalisée in vitro, ex vivo et in vivo. Les principaux arguments qui nous ont poussés à explorer cette piste sont les résultats décrits sur la délétion totale de MLCKnm chez la souris. Il a été démontré que les souris déficientes en MLCKnm sont protégées en termes de mortalité, contre le choc endotoxique dans deux modèles expérimentaux de sepsis (LPS et le modèle de ligature du caecum). Le mécanisme à l'origine de la résistance de ses souris est expliqué par une diminution de l'inflammation systémique et une préservation des organes vitaux, le cœur, foie et poumon par une baisse de l'expression de l'iNOS inflammatoire. Concernant l'inflammation systémique, la délétion de MLCKnm diminue l'hyperréactivité vasculaire induite par le LPS, l'activation de NF-kB, et l'augmentation du stress oxydant et nitrosant (Ralay Ranaivo et al, 2007). En se basant sur ces données, nous avons montré dans la deuxième partie de notre travail que la délétion de MLCKnm diminue les effets inflammatoires des MPs circulantes. On a observé que les MPs circulantes provenant des souris KO MLCKnm ont été incapables de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires, d'induire une dysfonction endothéliale sans augmenter le stress oxydatif et nitrosatif dans les cellules endothéliales. Ces résultats nous a conduit à proposer en premier temps que la délétion de MLCKnm pourrait être considérée comme une nouvelle stratégie de production des MPs à faible potentiel inflammatoire et qui pourrait servir par la suite à la génération des MPs avec plus d'intérêt thérapeutique.

En regardant les résultats précédemment décrits dans la littérature sur les souris KO MLCKnm, notre conclusion précédente était un peu précoce ou à vrai dire incomplète. Puisque les souris KO MLCKnm sont résistantes au choc septique par une diminution de l'inflammation systémique. De ce fait, nous avons évalué l'effet protecteur des MPs circulantes issues des souris KO MLCKnm dans les conditions inflammatoires (LPS). Il est déjà démontré que d'autres types de MPs pourraient avoir des effets anti-inflammatoires bénéfiques. Par exemple, les MPs produites par les neutrophiles humains activés réduisent la réponse inflammatoire médiée par les macrophages exposés au LPS par un mécanisme lié à l'annexine A1 (Dalli et al. 2008). Néanmoins, dans ce travail de thèse, nous démontrons que les MPs issues des souris KO MLCKnm corrigent partiellement la réponse inflammatoire provoquée par le LPS. En présence du LPS, les MPs circulantes issues des souris KO MLCKnm induisent la production des cytokines anti-inflammatoires et réduisent les cytokines proinflammatoires au niveau des cellules endothéliales; elles réduisent l'expression de la iNOS, de la production d'anion superoxyde et l'infiltration des macrophages dans la paroi vasculaire, et elles préviennent la dysfonction endothéliale accompagnée par une diminution du stress oxydant et nitrosant. Ces résultats suggèrent que MLCKnm pourrait être considérée comme une nouvelle cible utilisée dans la génération des MPs avec un potentiel protecteur.

Dans notre travail de thèse, nous montrons pour la première fois que les MPs circulantes issues des souris sauvages présentent des propriétés pro-inflammatoires *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Il est très difficile à expliquer que ces MPs, qui sont en exposition continue à la paroi vasculaire, présentent une telle propriété. Au même temps, il n'existe pas de données scientifiques expliquant cet effet. Dans la limite de nos résultats, nous pouvons suggérer que d'autres mécanismes de compensation peuvent exister, et que la paroi vasculaire des souris sauvages exposée à ces MPs pro-inflammatoires, libèrent d'autres facteurs circulants afin de compenser les effets néfastes de ces MPs, et maintenir l'homéostasie vasculaire.

Bien que la délétion de MLCKnm réduise les propriétés inflammatoires des MPs circulantes et augmente leurs effets protecteurs, les mécanismes moléculaires et les voies de signalisations impliquées restent inconnus. Un certain nombre de données bibliographiques peuvent nous fournir quelques éléments de réponse, mais il est très intéressant d'approfondir l'étude afin de mettre en évidence les cascades de signalisation impliquées à savoir la voie MLCKnm/NFκB et la voie MLCKnm/P-Src déjà démontré au niveau de l'athérosclérose (Sun et al., 2011).

Afin d'expliquer le résultat observé de la délétion de MLCKnm sur les propriétés inflammatoires des MPs circulantes, on s'est focalisé sur le rôle de MLCKnm au niveau de la signalisation inflammatoire. Plusieurs études montrent que MLCKnm contrôle la perméabilité para-cellulaire de l'endothélium vasculaire; permettant ainsi le passage des cellules inflammatoires (Norwood., 2000; Shen et al., 2010). De plus, au niveau de son extrémité N-terminale, MLCKnm possède plusieurs sites d'interaction avec des protéines de signalisation inflammatoire telle que P-Src et NF-KB conduisant à l'activation des voies de signalisation inflammatoires (Sun et al., 2011). Parallèlement à ces résultats, il a été démontré que MLCKnm participe à la translocation des sous unité de la NADPH oxydase (p47phox) à la membrane des cellules endothéliales. Suite à une hyperoxie, MLCKnm contribue à l'assemblage, et l'activation de la NADPH oxydase au niveau membranaire et par conséquence la génération d'un stress oxydant (Usatyuk et al., 2012). Toutes ces conclusions convergent vers la même direction que nos résultats actuels montrant les effets bénéfiques de la délétion de MLCKnm sur les propriétés inflammatoires des MPs circulantes. Bien que MLCKnm interagisse de manière physique avec plusieurs protéines pro-inflammatoires, nous pouvons faire l'hypothèse selon laquelle les MPs issues des souris KO MLCKnm pourraient porter plus de facteurs anti-inflammatoires que pro-inflammatoires à savoir des facteurs de transcription présentant des fonctions anti-inflammatoires et qui contribueraient à réduire

l'effet inflammatoire induit par le LPS sur les cellules cibles. Ces suggestions ouvrent de nouvelle perspective pour caractériser la composition des MPs issues des souris KO MLCKnm, via des études protéomiques, lipidomiques, et transcriptomiques.

Pour conclure, notre travail montre que MLCKnm apparaisse comme une cible thérapeutique potentielle pour moduler la libération des MPs. Le recours à la délétion de MLCKnm comme une nouvelle stratégie de modulation du message inflammatoire porté par les MPs circulantes a montré être capable d'augmenter le potentiel protecteur anti-inflammatoire des MPs. De façon intéressante, d'une part MLCKnm peut représenter un candidat potentiel dans la création de nouvelles stratégies prometteuses de génération des MPs in vitro comme un nouvel outil thérapeutique. D'autre part, MLCKnm pourrait être considérée comme une nouvelle cible thérapeutique afin d'orienter les effets biologiques des MPs in vivo et maintenir l'homéostasie de l'organisme vivant.

## **REVUES**

## **Extracellular vesicles: new players in cardiovascular diseases**

### **Revue 1:**

**Gaceb A**, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Extracellular vesicles: new players in cardiovascular diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014; 50; 24-28.

### **Implication dans la revue:**

Premier auteur: rédaction de la revue.

**Résumé:**

Les vésicules extracellulaires sont des fragments membranaires de petite taille, libérés par la plupart des cellules de l'organisme suite à une activation cellulaire ou apoptose. Ces vésicules sont porteuses de diverses protéines et également des acides nucléiques, participant à la régulation de nombreuses fonctions biologiques. En effet, elles initient la coagulation du sang, favorisent l'inflammation, modulent le système immunitaire et participent au maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. Cette revue traite le rôle des vésicules extracellulaires dans le développement des maladies cardiovasculaires, ainsi que leurs effets sur les cellules vasculaires et le myocarde.

Les vésicules extracellulaires représentent un moyen de transport des molécules biologiques induisant des effets délétères ou bénéfiques dans les maladies cardiovasculaires et plusieurs autres pathologies. Pour mieux comprendre leurs effets biologiques, des analyses du contenu des vésicules en transcriptome, protéome et lipidome sont nécessaires. Dans les jours à venir, les vésicules extracellulaires peuvent servir à l'élaboration d'un nouveau traitement dans les maladies cardiovasculaires, passant par l'ingénierie des vésicules qui consiste à sous-exprimer ou sur-exprimer une cible d'intérêt (ARNm, miRNA, protéines) dans les vésicules afin de contrôler leurs effets sur les cellules cibles.



## **Microparticles as regulators of cardiovascular inflammation**

### **Revue 2:**

Andriantsitohaina R, **Gaceb A**, Vergori L, Martinez MC. Microparticles as regulators of cardiovascular inflammation. *Trends Cardiovasc Med*. 2012; 22; 88-92.

### **Implication dans la revue:**

Co-auteur: rédaction d'une partie de l'introduction, la partie inflammation et la réalisation de la figure 1 de la revue.

**Résumé:**

Les microparticules sont des petites vésicules libérées par un bourgeonnement de la membrane plasmique suite à une activation cellulaire ou bien apoptose. Elles représentent un vecteur d'information biologique entre les cellules et participent ainsi à la modulation de la réponse inflammatoire. Des concentrations élevées de microparticules provenant des plaquettes, leucocytes, érythrocytes et cellules endothéliales sont associées aux différentes conditions pathologiques, y compris la thrombose, la septicémie, et l'inflammation. Cette revue résume le rôle des microparticules dans la modulation de l'inflammation au cours des maladies cardiovasculaires.

En plus de leur rôle de biomarqueur inflammatoire dans plusieurs pathologies cardiovasculaires, les microparticules peuvent moduler le profil pro-inflammatoire des cellules cibles de la paroi vasculaire. Cependant, des données récentes suggèrent que les microparticules peuvent également avoir des effets anti-inflammatoires. L'équilibre entre les effets pro-inflammatoires et anti-inflammatoires des microparticules doit être préservé pour obtenir une réponse inflammatoire adéquate. L'ingénierie des microparticules ayant des propriétés anti-inflammatoires pourrait bien représenter une nouvelle stratégie thérapeutique.

## **PUBLICATIONS**

**Circulating microparticles from patients with obstructive sleep apneas enhance vascular contraction: mandatory role of the endothelium**

**Article 1:**

Tual-Chalot S, Fatoumata K, Priou P, Trzepizur W, Gaceb A, Contreras C, Prieto D, Martinez MC, Gagnadoux F, Andriantsitohaina R. Circulating microparticles from patients with obstructive sleep apneas enhance vascular contraction: mandatory role of the endothelium. *Am J Pathol*. 2012; 181; 1473-1482.

**Implication dans le papier:**

Co-auteur: réalisation d'une partie des expériences de l'analyse de la fonction vasculaire par myographie.

## Résumé:

Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) est caractérisé par des cycles répétitifs d'apnée-hypopnée pendant le sommeil associé à une désaturation en oxygène. Nous avons évalué le rôle des microparticules (MPs) circulantes des patients atteints de SAOS dans la régulation de la fonction vasculaire. Des MPs issues des patients atteints de SAOS ou des sujets sains ont été injectées chez la souris. Les MPs provenant des patients SAOS induisent une hyperréactivité vasculaire dans les aortes à endothélium fonctionnel mais pas dans les aortes sans endothélium. L'hyperréactivité vasculaire a été réduite en présence d'un inhibiteur de la NO synthase seul ou combiné avec l'inhibiteur de la cyclo-oxygénase l'indométacine. Les MPs SAOS réduisent l'activité de la NO synthase endothéliale et la production du monoxyde d'azote, et augmentent l'expression de la cyclo-oxygénase-1 et la cyclo-oxygénase-2 ainsi que la thromboxane A2 et la prostacycline. Un blocage des récepteurs de la thromboxane A2 ne modifie pas la réponse de la sérotonine dans les artères des souris traitées par les MPs SAOS. Un superoxyde dismutase mimétique réduit l'hyperréactivité vasculaire induite par les MPs SAOS sans avoir d'effet sur la contraction des vaisseaux contrôle. Ces données montrent que les MPs circulantes des patients SAOS induisent ex vivo une hyperréactivité vasculaire impliquant l'endothélium via une interaction entre le monoxyde d'azote et les voies de la cyclo-oxygénase. Ces résultats mettent en évidence la participation des MPs dans la dysfonction vasculaire associée au SAOS.

**PPAR $\alpha$  regulates endothelial progenitor cell maturation and myeloid lineage differentiation through a NADPH oxidase-dependent mechanism in mice**

**Article 2:**

Vergori L, Lauret E, **Gaceb A**, Andriantsitohaina R, Martinez MC. PPAR $\alpha$  regulates endothelial progenitor cell maturation and myeloid lineage differentiation through a NADPH oxidase-dependent mechanism in mice.

Accepter dans *Stem Cells*.

**Implication dans le papier:**

Co-auteur: participation aux expériences d'isolement des cellules progénitrices, des microparticules circulantes, la résonance paramagnétique électronique et les expériences réalisées sur l'animal.

## Résumé:

Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR $\alpha$ ) est un modulateur clé du métabolisme lipidique. Dans ce travail, nous évaluons le rôle de PPAR $\alpha$  dans la maturation et la fonction des cellules progénitrices de la moelle osseuse. Bien que la délétion de PPAR $\alpha$  augmente le nombre des cellules résidentes de la moelle osseuse, la différenciation des cellules progénitrices endothéliales et monocytaires, elle altère la ré-endothélialisation de l'artère carotide lésée suite à une réduction des cellules progénitrices endothéliales circulantes. En outre, la délétion de PPAR $\alpha$  diminue l'effet pro-angiogénique in vivo de l'agoniste de PPAR $\alpha$  sans affecter les marqueurs de différenciation des cellules progénitrices endothéliales. Le traitement par le «Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)» augmente la population des cellules progénitrices monocytaires ainsi que le sécrétome des cellules dérivées de la moelle osseuse chez les souris sauvages PPAR $\alpha$  mais pas chez les souris délétées en PPAR $\alpha$ . En outre, les souris délétées en PPAR $\alpha$  affichent une réduction des lymphocytes et une augmentation des monocytes et neutrophiles circulants. Enfin, PPAR $\alpha$  régule négativement la production des espèces réactives de l'oxygène par le NADPH oxydase dans les cellules résidentes de la moelle osseuse. Ces données montrent que le PPAR $\alpha$  est un régulateur critique du homing, de la maturation et du recrutement des cellules progénitrices de la moelle osseuse.

**Vascular and hepatic impact of short-term intermittent hypoxia in a mouse model of metabolic syndrome**

**Article 3:**

Trzepizur W, **Gaceb A**, Arnaud C, Ribuot C, Levy P, Martinez MC, Gagnadoux F, Andriantsitohaina R. Vascular and hepatic impact of short-term intermittent hypoxia in a mouse model of metabolic syndrome.

En révision mineur dans *PLoS ONE*.

**Implication dans le papier:**

Co-auteur: réalisation des expériences de l'analyse de la fonction vasculaire par myographie.



## **Résumé:**

L'augmentation constante de l'obésité dans les populations occidentales accroît la prévalence de nombreuses maladies liées au surpoids parmi lesquelles le syndrome d'apnées hypopnées du sommeil (SAHOS). Le SAHOS et l'obésité représentent deux facteurs de risque indépendants du développement de maladie cardiovasculaires (CV) et métaboliques. Etant souvent associés en pratique clinique, l'étude de leurs effets vasculaires et métaboliques spécifiques est difficile. Pour nous affranchir de cette problématique, nous avons étudié chez la souris, les effets respectifs et combinés d'un régime riche en graisse et/ou de 15 jours d'exposition à des conditions d'hypoxie intermittente (HI) mimant le SAHOS, sur les paramètres vasculaires et métaboliques. L'HI seule n'avait aucun impact sur le bilan-glucido lipidique, la fonction mitochondriale hépatique et la fonction vasculaire des animaux. Les animaux soumis au RRG présentaient une dyslipidémie, une stéatose hépatique, une dysfonction mitochondriale ainsi qu'une dysfonction endothéliale. Lorsque l'HI était appliquée aux animaux recevant le RRG, l'ensemble de ces dysfonctions vasculaires, hépatiques et mitochondriales était prévenu mais une hyperinsulinémie marquée était notée.

Ce travail illustre les effets polymorphes de l'HI qui, pour des durées d'exposition courtes, pourrait présenter des effets bénéfiques sur les altérations associées à l'obésité qui contrastent avec les effets délétères à plus long terme décrits dans le SAHOS.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*. 2007;35(10):2408-2416.

Adamson RH, Zeng M, Adamson GN, Lenz JF, Curry FE. PAF- and bradykinin-induced hyperpermeability of rat venules is independent of actin-myosin contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(1):H406-417.

Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2008;10(5):619-624.

Amano M, Ito M, Kimura K, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*. 1996;271(34):20246-20249.

Anname D, Sébille V, Charpentier C, Bollaert PE, François B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troché G, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*. 2002;288(7):862-871.

Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101(10):3765-3777.

Balducci E, Cointe S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Microparticules circulantes, acteurs et marqueurs émergents en pathologie humaine. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2012; 42(443):29-38.

Bardelli C, Amoruso A, Federici Canova D, et al. Autocrine activation of human monocyte/macrophages by monocyte-derived microparticles and modulation by PPAR $\gamma$  ligands. *Br J Pharmacol*. 2012;165(3):716-728.

Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1997;99(9):2118-2127.

Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1998;102(1):136-144.

Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest.* 2008;118(2):413-420.

Benameur T, Tual-Chalot S, Andriantsitohaina R, Martínez MC. PPARalpha is essential for microparticle-induced differentiation of mouse bone marrow-derived endothelial progenitor cells and angiogenesis. *PLoS One* 2010;5(8):e12392.

Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1990;65(3):168-172.

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein c for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001;344(10):699-709.

Betapudi V, Lominadze G, Hsi L, Willard B, Wu M, McCrae KR. Anti-β2gpi antibodies stimulate endothelial cell microparticle release via a nonmuscle myosin ii motor protein-dependent pathway. *Blood* 2013;122(23):3808-3817.

Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(1):21-29.

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):1-5.

Breimo ES, Østerud B. Generation of tissue factor-rich microparticles in an ex vivo whole blood model. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005;16(6):399-405.

Bruno B, Ariel C, Emmanuelle BG, Catherine M, Ghislaine D, Stéphane E, Nabila H, Franck B. Cardiovascular diseases: epidemiology and medical care by both the cardiologist and the biologist. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2009;39(409):27-39.

Burke-Gaffney A, Keenan AK. Modulation of human endothelial cell permeability by combinations of the cytokines interleukin-1 alpha/beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunopharmacology.* 1993;25(1):1-9.

Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: A regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(10):791-800.

Camussi G, Deregibus MC, Cantaluppi V. Role of stem-cell-derived microvesicles in the paracrine action of stem cells. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(1):283-287.

Castellana D, Zobairi F, Martinez MC, et al. Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res.* 2009;69(3):785-793.

Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 2006;580(22):5313-5320.

Chan JY, Takeda M, Briggs LE, et al. Identification of cardiac-specific myosin light chain kinase. *Circ Res*. 2008;102(5):571-580.

Chargafe E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem*. 1946;166(1):189-197.

Chen TS, Lai RC, Lee MM, Choo AB, Lee CN, Lim SK. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(1):215-224.

Choi HK, Mount DB, Reginato AM, Physicians ACo, Society AP. Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med*. 2005;143(7):499-516.

Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*. 2001;3(4):339-345.

Colle IO, De Vriese AS, Van Vlierberghe HR, Lameire NH, De Vos MM. Vascular hyporesponsiveness in the mesenteric artery of anaesthetized rats with cirrhosis and portal hypertension: An in-vivo study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004;16(2):139-145.

Cui WJ, Liu Y, Zhou XL, Wang FZ, Zhang XD, Ye LH. Myosin light chain kinase is responsible for high proliferative ability of breast cancer cells via anti-apoptosis involving p38 pathway. *Acta Pharmacol Sin*. 2010;31(6):725-732.

Curtis AM, Wilkinson PF, Gui M, Gales TL, Hu E, Edelberg JM. p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J Thromb Haemost*. 2009;7(4):701-709.

Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, et al. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med*. 2008;36(1):296-327.

Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 2007;110(7):2440-2448.

Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest*. 2004;34(6):392-401.

Diehl P, Fricke A, Sander L, et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res*. 2012;93(4):633-644.

Dobryniewski J, Szajda SD, Waszkiewicz N, Zwierz K. [biology of essential fatty acids (efa)]. *Przegl Lek*. 2007;64(2):91-99.

Dudek SM, Chiang ET, Camp SM, et al. Abl tyrosine kinase phosphorylates nonmuscle Myosin light chain kinase to regulate endothelial barrier function. *Mol Biol Cell*. 2010;21(22):4042-4056.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.

Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time?. *Crit Care Med*. 1998;26(12):2078-2086.

Fujimi S, Ogura H, Tanaka H, et al. Activated polymorphonuclear leukocytes enhance production of leukocyte microparticles with increased adhesion molecules in patients with sepsis. *J Trauma*. 2002;52(3):443-448.

Gambim MH, do Carmo AeO, Marti L, Verissimo-Filho S, Lopes LR, Janiszewski M. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: Experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit Care*. 2007;11(5):R107.

Garcia JG, Davis HW, Patterson CE. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol*. 1995;163(3):510-522.

Garcia JG, Siflinger-Birnboim A, Bizios R, Del Vecchio PJ, Fenton JW, Malik AB. Thrombin-induced increase in albumin permeability across the endothelium. *J Cell Physiol*. 1986;128(1):96-104.

García-Palmieri MR. Primary and secondary prevention of cardiovascular disease in the elderly. *Bol Asoc Med P R*. 2000;92(1-3):3-8.

Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*. 2004;104(8):2543-2548.

Godin CM, Ferguson SS. The angiotensin II type 1 receptor induces membrane blebbing by coupling to Rho A, Rho kinase, and myosin light chain kinase. *Mol Pharmacol*. 2010;77(6):903-911.

Goeckeler ZM, Wysolmerski RB. Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *J Cell Biol*. 1995;130(3):613-627.



Grundey SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Fuster V. AHA/ACC scientific statement: Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34(4):1348-1359.

Harrison DA, Welch CA, Eddleston JM. The epidemiology of severe sepsis in england, wales and northern ireland, 1996 to 2004: Secondary analysis of a high quality clinical database, the icnarc case mix programme database. *Crit Care*. 2006;10(2):R42.

Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*. 2000;156(4):1363-1380.

Heemskerk JW, Vuist WM, Feijge MA, Reutelingsperger CP, Lindhout T. Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca<sup>2+</sup> responses. *Blood*. 1997;90(7):2615-2625.

Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*. 1999;94(11):3791-3799.

Helal O, Defoort C, Robert S, et al. Increased levels of microparticles originating from endothelial cells, platelets and erythrocytes in subjects with metabolic syndrome: relationship with oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011;21(9):665-671.

Ismail N, Wang Y, Dakhallallah D, et al. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*. 2013;121(6):984-995.

Itoh K, Hara T, Shibata N. Diphosphorylation of platelet myosin by myosin light chain kinase. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1133(3):286-292.

Itoh K, Hara T, Yamada F, Shibata N. Diphosphorylation of platelet myosin ex vivo in the initial phase of activation by thrombin. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1136(1):52-56.

Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FR. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic nad(p)h oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Crit Care Med*. 2004;32(3):818-825.

Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res*. 2003;109(4):175-180.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-257.

Kin H, Wang NP, Mykytenko J, et al. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappa B translocation and TNF alpha release. *Shock*. 2008;29(6):761-768.

Kissoon N, Carcillo JA, Espinosa V, Argent A, Devictor D, Madden M, Singhi S, van der Voort E, Latour J, Contributors GSIVC. World federation of pediatric intensive care and critical care societies: Global sepsis initiative. *Pediatr Crit Care Med*. 2011;12(5):494-503.

Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, Minami T, Kodama T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12: 138-142.

Koenig W. Inflammation and coronary heart disease: an overview. *Cardiol Rev*. 2001;9(1):31-35.

Kudryashov DS, Stepanova OV, Vilitkevich EL, et al. Myosin light chain kinase (210 kDa) is a potential cytoskeleton integrator through its unique N-terminal domain. *Exp Cell Res.* 2004;298(2):407-417.

Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN. Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol.* 1996;144(6):537-547.

Kunzelmann-Marche C, Freyssinet JM, Martínez MC. Regulation of phosphatidylserine transbilayer redistribution by store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: role of actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 2001;276(7):5134-5139.

Laher I. Microparticles have macro effects in sepsis. *Crit Care Med* 2011;39(7):1842-1843.

15. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med.* 2010;38(2 Suppl):S26-34.

Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:447-480.

Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, et al. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation.* 2009;119(21):2808-2817.

Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, et al. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(16):1302-1311.

Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med.* 2000;28(4 Suppl):N37-52.

- Liu ML, Reilly MP, Casasanto P, McKenzie SE, Williams KJ. Cholesterol enrichment of human monocyte/macrophages induces surface exposure of phosphatidylserine and the release of biologically-active tissue factor-positive microvesicles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(2):430-435.
- Lund T, Onarheim H, Reed RK. Pathogenesis of edema formation in burn injuries. *World J Surg.* 1992;16(1):2-9.
- Ma TY, Boivin MA, Ye D, Pedram A, Said HM. Mechanism of TNF- $\alpha$  modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(3):G422-430.
- Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med.* 2000;6(7):769-775.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1 $\beta$  by microvesicle shedding. *Immunity.* 2001;15(5):825-835.
- Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000;101(8):841-843.
- Martin S, Tesse A, Hugel B, et al. Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation.* 2004;109(13):1653-1659.
- Martínez MC, Larbret F, Zobairi F, et al. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood.* 2006;108(9):3012-3020.

Martínez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(3):H1004-1009.

Martínez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(3):H1004-1009.

Maseri A, Biasucci LM, Liuzzo G. Inflammation in ischaemic heart disease. *BMJ*. 1996;312(7038):1049-1050.

Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3(11):e442.

Mathers CD, Lopez AD, Murray CJL. The Burden of Disease and Mortality by Condition: Data, Methods, and Results for 2001. *Global Burden of Disease and Risk Factors*. 2001.

Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(7):1512-1518.

Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res*. 2010;107(9):1047-1057.

Mehta NN, Azfar RS, Shin DB, Neimann AL, Troxel AB, Gelfand JM. Patients with severe psoriasis are at increased risk of cardiovascular mortality: cohort study using the General Practice Research Database. *Eur Heart J*. 2010;31(8):1000-1006.

Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol.* 1998;161(8):4382-4387.

Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem.* 1999;274(33):23111-23118.

Meziani F, Tesse A, David E, et al. Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility. *Am J Pathol.* 2006;169(4):1473-1483.

Miguet L, Pacaud K, Felden C, et al. Proteomic analysis of malignant lymphocyte membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics.* 2006;6(1):153-171.

Miyoshi H, Umeshita K, Sakon M, et al. Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology.* 1996;110(6):1897-1904.

Mizock BA. The multiple organ dysfunction syndrome. *Dis Mon.* 2009;55(8):476-526.

Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol.* 2011;33(5):469-486.

Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, Burban M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, Pierrot M, Calès P, Henrion D, Andriantsitohaina R, et al. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med.* 2009;37(6):2045-2050.

Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, et al. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(11):1148-1155.

Moulin VJ, Mayrand D, Messier H, Martinez MC, Lopez-Vallé CA, Genest H. Shedding of microparticles by myofibroblasts as mediator of cellular cross-talk during normal wound healing. *J Cell Physiol*. 2010;225(3):734-740.

Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002;420(6917):846-852.

Neri T, Cordazzo C, Carmazzi Y, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists on the generation of microparticles by monocytes/macrophages. *Cardiovasc Res*. 2012;94(3):537-544.

Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, et al. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation*. 1997;96(10):3534-3541.

Nomura S, Kanazawa S, Fukuhara S. Effects of efonidipine on platelet and monocyte activation markers in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens*. 2002;16(8):539-547.

Norwood N, Moore TM, Dean DA, Bhattacharjee R, Li M, Stevens T. Store-operated calcium entry and increased endothelial cell permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(5):L815-824.

Ogura H, Tanaka H, Koh T, Fujita K, Fujimi S, Nakamori Y, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H. Enhanced production of endothelial microparticles with increased

binding to leukocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *J Trauma*. 2004;56(4):823-830; discussion 830-821.

Ohlmann P, Tesse A, Loichot C, et al. Deletion of MLCK210 induces subtle changes in vascular reactivity but does not affect cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(6):H2342-2349.

Ou ZJ, Chang FJ, Luo D, et al. Endothelium-derived microparticles inhibit angiogenesis in the heart and enhance the inhibitory effects of hypercholesterolemia on angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300(4):E661-668.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315-424.

Pérez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B, Zuzel M, Fukudome K, Toh CH. Microparticle-associated endothelial protein c receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica*. 2009;94(3):387-394.

Pérez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein c induces the release of microparticle-associated endothelial protein c receptor. *Blood*. 2005;105(4):1515-1522.

Pérez-Casal M, Thompson V, Downey C, Welters I, Wyncoll D, Thachil J, Toh CH. The clinical and functional relevance of microparticles induced by activated protein c treatment in sepsis. *Crit Care*. 2011;15(4):R195.

Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*. 1993;103(2):565-575.



Pasquet JM, Dachary-Prigent J, Nurden AT. Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets. *Eur J Biochem.* 1996;239(3):647-654.

Pétrilli V, Martinon F. The inflammasome, autoinflammatory diseases, and gout. *Joint Bone Spine.* 2007;74(6):571-576.

Priou P, Gagnadoux F, Tesse A, et al. Endothelial dysfunction and circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea. *Am J Pathol.* 2010;177(2):974-983.

Pugin J. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Found Symp.* 2007;280:21-27; discussion 27-36, 160-164.

Qi H, Wang P, Liu C, et al. Involvement of HIF-1 $\alpha$  in MLCK-dependent endothelial barrier dysfunction in hypoxia. *Cell Physiol Biochem.* 2011;27(3-4):251-262.

Ralay Ranaivo H, Carusio N, Wangenstein R, et al. Protection against endotoxic shock as a consequence of reduced nitrosative stress in MLCK210-null mice. *Am J Pathol.* 2007;170(2):439-446.

Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia.* 2006;20(9):1487-1495.

Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhelawon B, et al. Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circ Res.* 2011;108(3):335-343.

Rautou PE, Vion AC, Amabile N, et al. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res.* 2011;109(5):593-606.

Reich CF, Pisetsky DS. The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis. *Exp Cell Res*. 2009;315(5):760-768.

Reid VL, Webster NR. Role of microparticles in sepsis. *Br J Anaesth*. 2012;109(4):503-513.

Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(10):776-787.

Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M, Group EG-DTC. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2001;345(19):1368-1377.

Rolli J, Loukili N, Levrant S, Rosenblatt-Velin N, Rignault-Clerc S, Waeber B, Feihl F, Pacher P, Liaudet L. Bacterial flagellin elicits widespread innate immune defense mechanisms, apoptotic signaling, and a sepsis-like systemic inflammatory response in mice. *Crit Care*. 2010;14(4):R160.

Rosenson RS, Lowe GD. Effects of lipids and lipoproteins on thrombosis and rheology. *Atherosclerosis*. 1998;140(2):271-280.

Sabatier F, Darmon P, Hugel B, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes*. 2002;51(9):2840-2845.

Sanchez T, Skoura A, Wu MT, Casserly B, Harrington EO, Hla T. Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(6):1312-1318.

Sapet C, Simoncini S, Lloriod B, et al. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood*. 2006;108(6):1868-1876.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6):821-832.

Sebbagh M, Renvoizé C, Hamelin J, Riché N, Bertoglio J, Bréard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*. 2001;3(4):346-352.

Shen Q, Rigor RR, Pivetti CD, Wu MH, Yuan SY. Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. *Cardiovasc Res*. 2010;87(2):272-280.

Shin JW, Swift J, Ivanovska I, Spinler KR, Buxboim A, Discher DE. Mechanobiology of bone marrow stem cells: from myosin-II forces to compliance of matrix and nucleus in cell forms and fates. *Differentiation*. 2013;86(3):77-86.

Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost*. 2007;97(3):425-434.

Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R, Martínez MC. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis*. 2009;30(4):580-588.

Soleti R, Lauret E, Andriantsitohaina R, Carmen Martínez M. Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(11):2159-2170.

Sun C, Wu MH, Yuan SY. Nonmuscle myosin light-chain kinase deficiency attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced endothelial barrier dysfunction and monocyte migration. *Circulation*. 2011;124(1):48-57.

Symmons DP, Gabriel SE. Epidemiology of CVD in rheumatic disease, with a focus on RA and SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(7):399-408.

Takashima S. Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction. *Circ J*. 2009;73(2):208-213.

Tans G, Rosing J, Thomassen MC, Heeb MJ, Zwaal RF, Griffin JH. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood*. 1991;77(12):2641-2648.

Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*. 2002;160(2):673-680.

Tesse A, Meziani F, David E, Carusio N, Kremer H, Schneider F, Andriantsitohaina R. Microparticles from preeclamptic women induce vascular hyporeactivity in vessels from pregnant mice through an overproduction of no. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(1):H520-525.

Tournadre A. Therapeutic strategy in inflammatory myopathies (polymyositis, dermatomyositis, overlap myositis, and immune-mediated necrotizing myopathy). *Rev Med Interne*. 2014;35(7):466-471.

Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002;420(6917):853-859.

Tual-Chalot S, Guibert C, Muller B, Savineau JP, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(2):261-268.

Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R, Martínez MC. Microvesicles: intercellular vectors of biological messages. *Mol Interv.* 2011;11(2):88-94.

Usatyuk PV, Singleton PA, Pendyala S, et al. Novel role for non-muscle myosin light chain kinase (MLCK) in hyperoxia-induced recruitment of cytoskeletal proteins, NADPH oxidase activation, and reactive oxygen species generation in lung endothelium. *J Biol Chem.* 2012;287(12):9360-9375.

VanWijk MJ, Nieuwland R, Boer K, van der Post JA, VanBavel E, Sturk A. Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: possible involvement in vascular dysfunction? *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(2):450-456.

Vanwijk MJ, Svedas E, Boer K, Nieuwland R, Vanbavel E, Kublickiene KR. Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(6):1686-1693.

Verin AD, Lazar V, Torry RJ, Labarrere CA, Patterson CE, Garcia JG. Expression of a novel high molecular-weight myosin light chain kinase in endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19(5):758-766.

Wainwright MS, Rossi J, Schavocky J, et al. Protein kinase involved in lung injury susceptibility: evidence from enzyme isoform genetic knockout and in vivo inhibitor treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):6233-6238.

Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 2011;17(11):1410-1422.

Weerheim AM, Kolb AM, Sturk A, Nieuwland R. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Anal Biochem.* 2002;302(2):191-198.

Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13(3):269-288.

Wraith KS, Magwenzi S, Aburima A, Wen Y, Leake D, Naseem KM. Oxidized low-density lipoproteins induce rapid platelet activation and shape change through tyrosine kinase and Rho kinase-signaling pathways. *Blood.* 2013;122(4):580-589.

Wysolmerski RB, Lagunoff D. Regulation of permeabilized endothelial cell retraction by myosin phosphorylation. *Am J Physiol.* 1991;261(1 Pt 1):C32-40.

Xia ZY, Yang H, Qu HQ, Cheng WD, Wang LX. Impact of carotid artery stenting on plasma interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  and C-reactive protein. *Int Angiol.* 2012;31(1):28-32.

Yan R, Wang Z, Yuan Y, Cheng H, Dai K. Role of cAMP-dependent protein kinase in the regulation of platelet procoagulant activity. *Arch Biochem Biophys.* 2009;485(1):41-48.

Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, et al. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One.* 2009;4(3):e4722.

Yuan SY, Breslin JW, Perrin R, et al. Microvascular permeability in diabetes and insulin resistance. *Microcirculation.* 2007;14(4-5):363-373.

Zafrani L, Gerotziafas G, Byrnes C, et al. Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(7):744-755.

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2(100):ra81.

# Thèse de Doctorat

Abderahim GACEB

**Titre de thèse:** Modulation des réponses inflammatoires par les microparticules

**Title of thesis:** Modulation of inflammatory responses by microparticles

## Résumé

Les microvésicules (MVs) sont des petites vésicules membranaires libérées par les cellules, ayant des effets bénéfiques et/ou délétères dans le sepsis. Nous avons déjà démontré que la délétion de l'isoforme non musculaire de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCKnm) protège les souris contre le choc endotoxique en réduisant l'inflammation. Ici, nous avons évalué les conséquences de la délétion de MLCKnm sur le phénotype et les effets inflammatoires des MVs au cours du choc endotoxique. La délétion de MLCKnm augmente le taux circulant des MVs et ceux dérivées des cellules progénitrices. Les souris MLCKnm<sup>-/-</sup> présentent une augmentation du nombre des plaquettes, mais leurs capacité à libérer les MVs est réduite et une diminution du nombre des leucocytes et des MVs leucocytaires. Une diminution du relâchement de l'aorte a été observé chez les souris injectées avec des MVs dérivées des souris MLCKnm<sup>+/+</sup> (MVs<sup>MLCKnm+/+</sup>), mais pas les MVs dérivées des souris MLCKnm<sup>-/-</sup> (MVs<sup>MLCKnm-/-</sup>). En présence de lipopolysaccharide (LPS), MVs<sup>MLCKnm+/+</sup> augmentent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales de l'aorte de souris alors que les MVs<sup>MLCKnm-/-</sup> induisent la libération des cytokines anti-inflammatoires. L'injection des MVs<sup>MLCKnm-/-</sup>, prévient partiellement l'augmentation du stress oxydatif, nitrosatif, et la dysfonction endothéliale induites au niveau des souris par le LPS. Ces résultats montrent que MLCKnm joue un rôle important dans l'activation cellulaire, la libération des MVs, ainsi que le nombre des cellules circulantes. La délétion de MLCKnm permet de générer des MVs circulantes moins inflammatoires avec un potentiel protecteur.

## Mots clés

MLCKnm, microvésicules, LPS, cellules endothéliales-----

## Abstract

Microvesicles (MVs), small membrane vesicles released from cells, have beneficial and/or deleterious effects in sepsis. We previously reported that non-muscle myosin light chain kinase (nmMLCK) deletion protects mice against endotoxic shock by reducing inflammation. Here, we evaluated the consequences of nmMLCK deletion on the phenotype and inflammatory effects of cell-derived MVs during endotoxic shock. nmMLCK deletion increased circulating levels of MVs. In nmMLCK<sup>-/-</sup> mice, platelet count was increased but the platelet ability to release MVs was reduced, and both leukocyte-derived MVs and leukocyte count were reduced. Endothelium-dependent relaxation of aorta was reduced in mice injected with MVs from nmMLCK<sup>+/+</sup> (MVs<sup>nmMLCK+/+</sup>) but not from nmMLCK<sup>-/-</sup> mice (MVs<sup>nmMLCK-/-</sup>). In presence of lipopolysaccharide, MVs<sup>nmMLCK+/+</sup> increased pro-inflammatory cytokine release by mouse aortic endothelial cells whereas MVs<sup>nmMLCK-/-</sup> enhanced anti-inflammatory secretome. Injection of MVs<sup>nmMLCK-/-</sup>, but not MVs<sup>nmMLCK+/+</sup>, prevented the increase of oxidative and nitrate stresses and reduced endothelial dysfunction in aorta from lipopolysaccharide-treated mice. Altogether, nmMLCK plays an important role in cellular activation and release of circulating MVs. Moreover, nmMLCK deletion generates MVs with low inflammatory properties and high protective effects.

## Key Words

nmMLCK, extracellular vesicles, LPS, endothelial cells -